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

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO
ALÉRGENO FOSFOLIPASE A1 DO VENENO DE *Polybia paulista*
(HYMENOPTERA: VESPIDAE).

FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA

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

Rio Claro-SP
Março-2012

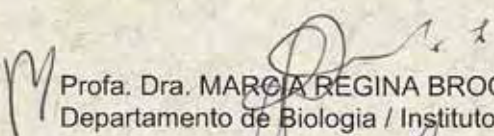
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

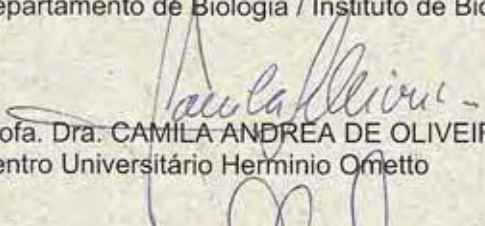
TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO ALÉRGENO FOSFOLIPASE A1 DO VENENO DE *Polybia paulista* (HYMENOPTERA: VESPIDAE)

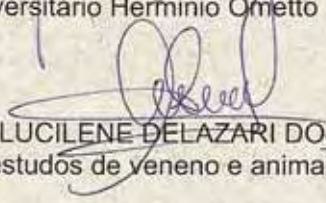
AUTOR: FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:

 Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

 Profa. Dra. CAMILA ANDREA DE OLIVEIRA
Centro Universitário Herminio Ometto

 Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS
Centro de estudos de veneno e animais peçonhentos CEVAP - UNESP

Data da realização: 23 de fevereiro de 2012.

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

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO
ALÉRGENO FOSFOLIPASE A1 DO VENENO DE *Polybia paulista*
(HYMENOPTERA; VESPIDAE).



Mestrando: Franco Dani Campos Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto Braga

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

**Rio Claro – São Paulo – Brasil
Março/2012**

547.75 Pereira, Franco Dani Campos
P436c Caracterização molecular e expressão Heteróloga do
Alérgeno Fosfolipase A1 do Veneno de Polybia paulista
(Hymenoptera: vespidae). / Franco Dani Campos Pereira. -
Rio Claro : [s.n.], 2012
93 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Márcia Regina Brochetto Braga

1. Proteínas. 2. Proteínas recombinantes. 3. fosfolipase
A1. 4. clonagem. 5. Western Blotting. 6. Alérgeno
recombinante. I. Título.

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

Dedicatória

Dedico esta dissertação a duas pessoas que já não estão mais entre nós, mas cuja honra, carinho e dignidade sempre me servirão de modelo. O nome de uma era Maria Salomé, minha avó e o nome do outro Joaquim Campos, meu avô. Talvez estas qualidades não venham com o sangue, mas sim, com a educação. Nunca conseguirei estimar o quanto devo a estes dois.

Agradecimentos

A Deus pela beleza e complexidade da vida e pelas bênçãos que abriram portas durante toda minha vida;

Aos meus pais pelas palavras de carinho e amor, por tudo que fizeram por mim sem medir esforços e por sempre me incentivarem nos momentos que pensei em desistir;

A professora Márcia Regina Brochetto Braga, pela oportunidade e pela confiança depositada durante todo o meu percurso de pós-graduando;

As companheiras do Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes, Débora Jacomine e Danielli Giratto, pela ajuda, conversas engraçadas e bons momentos que passamos juntos;

Aos amigos do Departamento em especial Larissa Nogarol, Edmara Nico, Vlamir Bozzato e Andrea Mendez pela amizade e paciência sempre;

Ao técnico do laboratório Anderson Rodrigues pela ajuda com os inacabáveis géis de poliacrilamida;

À Universidade Estadual Paulista – UNESP, em especial ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela oportunidade de realização deste trabalho;

A CAPES pela bolsa de Mestrado, a FAPESP e FUNDUNESP pelo apoio financeiro.

“Pense em mover o mundo
O primeiro passo é mover a si mesmo.”

Platão

“Você nunca sabe a força que tem,
até que a sua única alternativa é ser forte.”

Johnny Depp

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	12
Lista de figuras.....	13
Lista de Tabelas.....	17
1. Introdução.....	19
1.1 Grupo Aculeata.....	19
1.2 Acidentes com Hymenoptera sociais.....	19
1.3 Componentes do veneno.....	20
1.4 Fosfolipases.....	21
1.5 Clonagem e expressão heterologa em <i>Escherichia coli</i>	25
1.6 Imunoterapia (IT).....	26
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. Material e métodos.....	31
3.1 Material Biológico.....	31
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Extração de RNA.....	31
3.2.2 Síntese de cDNA.....	31
3.2.3 Iniciadores gene – específicos.....	32
3.2.4 Amplificação de cDNA gene – específico de PLA1.....	32
3.2.5 Purificação do produto de PCR a partir de gel de agarose.....	33
3.2.6 Clonagem para amplificação do cDNA de PLA1.....	34
3.2.6.1 Reação de ligação.....	34
3.2.6.2 Transformação.....	34
3.2.6.3 Extração de DNA plasmidial (“minipreps”).....	35
3.2.6.4 Análise de restrição.....	35
3.2.6.5 Sequenciamento dos plasmídeos TOPO/GW-PLA1Rec.....	35
3.2.6.6 Análise das seqüências.....	35
3.2.7 Obtenção de bactérias <i>E. coli</i> BL21- DE3, XL1-Blue e DH5 α competentes.....	36
3.2.8 Transformação das células DH5 α para Amplificação do vetor de expressão pET-28a.....	37

3.2.9	Desenho dos iniciadores para expressão da PLA1-Rec.....	37
3.2.10	Uso dos iniciadores de expressão para a amplificação do cDNA de PLA1 de <i>P. paulista</i> e clonagem em vetor pCR®8/GW/TOPO®	38
3.2.11	Dupla digestão do vetor pET-28a e da construção plasmidial PLA1_Rec2..	38
3.2.11.1	Desfosforilação do vetor de expressão pET-28a.....	39
3.2.11.2	Construção do Vetor de Expressão pET-28a_PLA1 e transformação em células XL1-Blue.	39
3.2.12	Transformação das células BL21-DE3 com pET-28a_PLA1.....	40
3.2.13	Padronização das condições de expressão de PLA1_Rec (fosfolipase A1 recombinante) em pequena escala.	40
3.2.14	Expressão e purificação de PLA1_Rec em maior escala.	41
3.2.15	Preparação dos extratos protéicos brutos dos venenos de <i>P. paulista</i> e de outros insetos sociais (Hymenoptera).	42
3.2.16	Dosagem de proteínas totais.....	42
3.2.17	Eletroforese preparativa do veneno de <i>P. paulista</i> em gel desnaturante de poli(acrilamida) e imunização de camundongos BALB-C	42
3.2.18	Análise de <i>Western blotting</i>	43
3.2.19	Imunodeteção	44
3.2.20	Modelagem da estrutura tridimensional da PLA1	44
4.	Resultados e discussão	46
4.1	Extração de RNA total	46
4.2	Síntese do cDNA	46
4.3	Amplificação da sequência de cDNA do gene PLA1	47
4.4	Clonagem de cDNA e sequenciamento dos clones	48
4.5	Análises das seqüências de nucleotídeos da PLA1 de <i>P. paulista</i>	49
4.6	Análise da proteína PLA1 traduzida.....	53
4.7	Análise dos domínios protéicos conservados	55
4.8	Caracterização da proteína deduzida e depósito da sequência de cDNA de PLA1 no GenBank.....	56
4.9	Construção do modelo estrutural da proteína PLA1 deduzida pela sequência de cDNA, utilizando-se a técnica de homologia	57
4.10	Preparação de anticorpos policlonais contra a PLA1 natural.....	63

4.10.1 Eletroforese preparativa de extratos de veneno bruto de <i>P. paulista</i> em géis desnaturantes de poliacrilamida e isolamento da fração eletroforética de PLA1 para imunização em camundongos BALB/c.....	63
4.10.2 Análise da especificidade e reatividade imunológica cruzada dos anticorpos policlonais produzidos contra a fração eletroforética correspondente a PLA1 do veneno bruto de <i>P. paulista</i>	64
4.11 Amplificação e Clonagem da PLA1-Rec	66
4.12 Amplificação e purificação do vetor de expressão pET-28a	68
4.13 Transformação das células BL21-DE3 com os plasmídeos pET-28a -PLA1	71
4.14 Crescimento das células BL21-DE3 transformadas com plasmídeos pET-28a_ PLA1	71
4.15 Purificação da proteína recombinante PLA1-Rec	73
4.16 Análise da especificidade dos anticorpos policlonais anti-PLA1 natural no reconhecimento da PLA1-Rec.....	75
5. Discussão geral	78
6. Conclusões	83
7. Referências Bibliográficas.....	85

Resumo

Polybia paulista é uma vespa pertencente à ordem Hymenoptera muito comum no Sudeste do Brasil, especialmente no Estado de São Paulo. Os venenos destes insetos são constituídos por amins, peptídeos, proteínas de alta massa molecular, sendo estas na sua maioria, enzimas. As fosfolipases são as enzimas de maior abundância entre os alérgenos de veneno dos Hymenoptera sociais, constituindo-se também no alérgeno de maior importância. A sequência completa de 985 pb do cDNA da fosfolipase A1 do veneno da vespa *P. paulista* foi determinada a partir da clonagem. A proteína deduzida por tradução apresentou 302 resíduos de aminoácidos, PI e MW teóricos de 9,1 e 33 kDa respectivamente. Por meio de ferramentas de bioinformática foi possível identificar o sítio ativo entre os resíduos 131 a 140 (10 aminoácidos) e inferir que se trata de uma proteína da super família das esterases lipases. O cDNA completo foi clonado em vetor de expressão pET-28a em cepas de *Escherichia coli* BL21–DE3. A PLA1-Rec com cauda de 6x Histidinas no N- terminal foi expressa na forma insolúvel em corpúsculos de inclusão por meio da indução com 1mM de IPTG à 20°C por 6 horas. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em resina agarose-Ni⁺² sob condições desnaturantes na presença de 8 M de uréia e a proteína eluída com tampão gradiente decrescente de pH. As análises de *Western blotting* revelaram a especificidade dos anticorpos policlonais produzidos em camundongos contra a fração eletroforética de PLA1 natural quando testados com o veneno bruto da própria vespa e com a PLA1- Rec de *P. paulista*. Além disto, estes anticorpos apresentaram imunoreatividade cruzada com o veneno bruto de outras vespas sociais testadas neste trabalho. Outras proteínas detectadas na membrana de nitrocelulose evidenciaram o reconhecimento dos anticorpos às outras isoformas de fosfolipase já descritas na literatura. A obtenção da forma recombinante deste importante alérgeno do veneno da vespa abre um leque de perspectivas para estudos do mecanismo de ação tanto bioquímico quanto imunológico como também para a determinação de sua estrutura por cristalografia de raios-x e do seu potencial de uso em diagnósticos de alergias e imunoterapias alérgeno-específicas.

Palavras-chave: Veneno de *Polybia paulista*, fosfolipase A1, clonagem, Western Blotting, alérgeno recombinante.

Abstract

Abstract

Polybia paulista is a wasp that belongs to the Hymenoptera order very common in southeastern Brazil, especially in São Paulo. The venoms of these insects are composed of amines, peptides, high weight molecular proteins, which are mainly enzymes. The phospholipase enzymes are the most abundant among the allergens of social Hymenoptera venom, and they are also the most important allergen. The complete sequence of 985 bp of phospholipase A1 cDNA from *P. paulista* venom was determined by cloning. The protein inferred by translation had 302 amino acid residues, PI and theoretical MW of 9.1 and 33 kDa respectively. By means of bioinformatics tools, it was possible to identify the active site between residues 131 to 140 (10 amino acids) and infer that it is a protein that belongs to esterases lipases super family. The complete cDNA was cloned into pET-28a expression vector in strains of BL21-DE3 *Escherichia coli*. The Rec-PLA1 with 6x histidine tail at the N-terminal was expressed in insoluble form in inclusion corpuscles by induction with 1mM IPTG at 20 ° C for 6 hours. The purification was performed by affinity chromatography on agarose-Ni⁺² resin under denaturing conditions in the presence of 8 M urea and the protein eluted with decreasing pH gradient buffer. The *Western blotting* analyses revealed the specificity of polyclonal antibodies produced in mice against the electrophoretic fraction of natural PLA1 when tested with the crude venom of the wasp itself and with the PLA1- Rec of *P. paulista*. Besides these antibodies presented cross-immunoreactivity with the crude venom of other social wasps tested in this work. Other proteins detected in the nitrocellulose membrane showed the recognition of antibodies to other isoforms of phospholipase already described in the literature. Obtaining the recombinant form of this important allergen from wasp venom opens a wide range of perspectives for studies of biochemical and immunological mechanisms of action to determine its structure by x-ray crystallography and its potential use in allergies diagnostics and allergen-specific immunotherapy.

Keywords: *Polybia paulista* venom, phospholipase A1, cloning, *Western blotting*, recombinant allergen.

Lista de figuras

- Figura 1.** Sítios de ação de fosfolipases sobre glicerofosfolipídeos. Retirado de Oliveira (2006). 22
- Figura 2.** Perfil eletroforético de amostras de RNA total de *P. paulista*, em gel de agarose a 2%, em TAE 1X com formaldeído (Sambrook et al., 2001). Nas canaletas **2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8**, foram aplicadas, amostras de RNA referentes à extração do material depois de no mínimo, 7 dias em TRIzol a - 85°C. **M** corresponde ao DNA ladder de 1 kb (de 100 a 12.000 pb). Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green:amostra). 46
- Figura 3.** Perfil eletroforético de cDNA de *P. paulista*, em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X. Nas canaletas de **1 a 6** estão as amostras de cDNA sintetizadas com a enzima RT- Improm (Promega). **M** corresponde ao padrão de DNA "ladder" de 1 Kb. Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green: amostra). 47
- Figura 4.** Banda correspondente ao fragmento de cDNA de ~1000 pb, amplificado em temperatura de anelamento de 57,5°C e concentração de 0,4 µM de cada um dos iniciadores do par PLA1F/AMP. À esquerda, **M** refere-se ao DNA ladder de 100 pb (de 100 a 12.000 pb). A análise foi realizada em gel de agarose 1,5%, TAE 1X e a amostra visualizada com Blue Green (1:5 v/v; corante:amostra). 47
- Figura 5.** Fragmento, à direita, correspondente ao cDNA de PLA1 de ~1000 pb resultante da eletroforese em gel de agarose 1%, TAE 1X de grande volume do fragmento de cDNA de PLA1 para posterior eluição e purificação. À esquerda, **M** refere-se ao DNA ladder de 100 pb (de 100 a 12.000 pb). As bandas foram visualizadas com Blue Green (1:5 v/v; corante:amostra). 48
- Figura 6.** Resultado das análises de restrição com a enzima *EcoRI*, dos DNAs plasmidiais TOPO/GW-PLA1 recombinantes provenientes de cinco dos dez clones positivos de células *E. coli* One Shot[®] Mach1[™]T1^R, contendo o cDNA de PLA1 do veneno de *P. paulista*. As amostras foram aplicadas lado a lado: plasmídeos não clivados (**P**) e plasmídeos clivados (2817pb) mais os insertos com tamanhos de ~1000 pb (**CI**) respectivamente. As amostras foram visualizadas com Blue Green (1:5 v/v; corante:amostra). 48
- Figura 7.** Resultado da análise de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) evidenciando os registros em banco de dados para as sequências de maior grau de similaridade com a sequência de PLA1 estudada. 50
- Figura 8.** Alinhamento das sequências de cDNA da PLA1 de *P. paulista* determinada neste trabalho com as de *P. annularis*, *P. dominulus* e de *P. paulista* obtida por Santos, (2007). (Servidor Uniprot: www.uniprot.org/align_alignment). Em cinza estão evidenciadas regiões de similaridade de sequência entre estas espécies. Notar as regiões não concordantes entre as sequências de cDNA obtidas por Santos, 2007 e por este trabalho, indicativo da existência de polimorfismo entre eles. 51
- Figura 9.** Alinhamento das sequências de cDNA da PLA1 de *P. paulista* obtida por Santos (2007) e da sequência obtida no presente trabalho pelo programa Multalin. Em vermelho são evidenciadas as regiões de similaridade entre as duas sequências e o retângulo em destaque indica as diferenças de nucleotídeos na região onde o iniciador reverso, descrito por Santos (2007) deveria se anelar. 52
- Figura 10.** Alinhamento das sequências de aminoácidos do alérgeno PLA1 dos venenos de

- P. dominulus*, *P. annularis* e *P. paulista* depositada por Santos (2007), e da sequência de *P. paulista* determinada neste trabalho. 54
- Figura 11.** Resultado da análise de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostrando em vermelho que a proteína fosfolipase A1 de *P. paulista* é integrante da superfamília das esterases/lipases. 55
- Figura 12.** Motivos conservados encontrados na sequência de PLA1 de *P. paulista*. Dentro da caixa vermelha estão os motivos conservados da mesma super família e em cinza os outros dois motivos independentes. 55
- Figura 13.** Análise teórica da posição do sitio ativo da enzima alergênica PLA1 de *P. paulista* utilizando o software Expasy-Prositate (<http://ca.expasy.org/prosite/>), mostrando que o mesmo deve estar localizado entre os resíduos 131 e 140. 56
- Figura 14.** Alinhamento entre as sequências primárias de lipase pancreática de cobaias (1GPL) e PLA1 de *P. paulista*. As regiões de identidade mais importantes foram assinaladas em cinza escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados. O alinhamento foi feito utilizando o servidor Uniprot (www.uniprot.org/align_alignment). 57
- Figura 15.** Modelo tridimensional, gerado pelo programa MODELLER (SALI et al., 1993) e visualizado pelo programa PyMol (DELANO, 2004) para a proteína PLA1 do veneno da vespa *P. paulista*. A proteína foi deduzida por tradução da sequência de bases de seu cDNA completo, o qual foi clonado, seqüenciado e analisado em Banco de Dados. Observa-se que a PLA1 de *P. paulista* apresenta uma formação do tipo sanduíche beta, constituída por oito fitas betas antiparalelas ligadas a sete alfas hélices e por "loops". 59
- Figura 16.** Triade catalítica formada pelos resíduos His226, Asp165, e Ser137, responsáveis pela ligação ao substrato. 59
- Figura 17.** Modelo protéico tridimensional da PLA1 do veneno de *P. paulista* mostrando as duas pontes dissulfeto formadas entre os resíduos Cys263-Cys268 e entre Cys219-Cys224. 61
- Figura 18.** Modelo tridimensional da proteína PLA1 do veneno de *P. paulista* evidenciando em roxo as dezesseis regiões potencialmente imunogênicas (epítomos) presentes na molécula tanto na forma conformacional (Doze regiões) quanto lineares (Quatro). 61
- Figura 19.** Perfil protéico em SDS-PAGE preparativo de gradiente (10-18%) de poliacrilamida, do extrato bruto do veneno de *P. paulista*. A amostra aplicada continha cerca de 10 mg de proteínas totais. As bandas foram coradas com Coomassie Blue G-250 e a seguir a faixa de massa molecular de 12-19 KDa, indicada na imagem pela chave à direita, foi recortada do gel para imunização de camundongos BALB/c fêmeas. À esquerda tem-se um padrão protéico pré corado de alta massa (225, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa) utilizado para o cálculo de massa molecular de cada banda. 64
- Figura 20.** Western Blotting utilizando o anticorpo policlonal produzido em camundongos BALB/c contra a fração eletroforética de PLA1 do veneno de *P. paulista*, para análise de sua especificidade à fosfolipase do mesmo veneno (1) e o nível de imunoreatividade cruzada entre os extratos brutos dos venenos de 2- *Polybia sericea*, 3- *Polybia ignobilis*, 4- *Agelaia pallipes pallipes*, 5- *Polistes lanio lanio*, 6- *Apis mellifera* e 7- *Solenopsis invicta*. No gel de sistema desnaturante de poliacrilamida (15%), foram aplicadas 80 µg de proteínas totais de cada um destes extratos. 65

- Figura 21.** Histograma relativo à análise densitométrica do perfil de *Western Blotting* da Figura 20, em que a intensidade das bandas foi quantificada em unidades arbitrárias para melhor comparação dos resultados. Observar a maior intensidade da reação cruzada da PLA1 de *P. paulista* com a fosfolipase (15-16 kDa) no veneno da vespa *P. lanio lanio*. 66
- Figura 22.** (A) Perfil eletroforético da banda correspondentes ao cDNA de 909 pb amplificado a partir das preparações plasmidiais de TOPO/GW_PLA1Rec, usando-se os iniciadores de expressão. À esquerda, **M** refere-se ao marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder (300 a 10.000 pb). (B) Resultado das análises de dupla-restrição dos DNAs plasmidiais recombinantes de PLA1_Rec2 (D1- D9) com enzimas *EcoR1* e *Nde1*. À esquerda, P1-P9, estão os plasmídeos não clivados. Pode-se constatar que as bandas correspondentes aos plasmídeos clivados apresentam tamanho de 2817 pb, enquanto que as bandas correspondentes ao inserto são de 909 pb. A análise foi realizada em gel de agarose 1,5% em TAE 1x e a amostra visualizada com Blue Green (1:5, Blue Green: amostra). 68
- Figura 23.** (A) Bandas correspondentes ao DNA plasmidial do vetor pET-28a purificado por meio de “minipreps”, apresentando 5369 pb. A análise foi realizada em gel de agarose 1,5%, em TAE 1x e a amostra visualizada com Blue Green. Em (B, C) tem-se os perfis eletroforéticos em géis de agarose 1% em TAE 1X, das preparações plasmidiais do vetor de expressão pET-28a (1) e da construção plasmidial PLA1_Rec2 (2 e 3). (B) após a reação de digestão dupla com as enzimas *EcoR1* e *Nde I*. (C) mesmo gel após recorte das bandas, as quais foram eluídas e, em seguida utilizadas nas reações de ligação. 69
- Figura 24.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em TAE 1X, mostrando as preparações plasmidiais de pET-28a_PLA1 após reação de digestão com enzimas de restrição *EcoR1* e *Nde1*. Observar que os clones 1, 2, 3 e 6 apresentaram o inserto de PLA1 com o tamanho esperado de ~ 800 pb, enquanto que nos demais nada foi observado. 70
- Figura 25.** Crescimento da cultura recombinante de pET28a_PLA1 (proveniente do clone 1) em células *E. coli* BL21- DE3. 71
- Figura 26.** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 15% das proteínas totais extraídas da cultura de bactérias a partir do clone 1 (Frações solúveis – Fs e Frações insolúveis – Fi), após os diferentes tempos de expressão da proteína recombinante PLA1. À esquerda, tem-se as Fs dos tempos 0, 2, 4 e 6 horas, à direita as Fi dos tempos 0, 2, 4, 6 e 10 horas. Observar presença da banda protéica mais intensa de 34 kDa nas frações insolúveis e sua ausência na Fi do tempo 0. As proteínas do gel foram coradas com Coomassie Blue G-250. M corresponde ao marcador de massa molecular de 12 a 225 kDa. 73
- Figura 27.** Perfil protéico, em SDS-PAGE a 15%, das etapas de purificação da proteína recombinante PLA1 com cauda de histidina, em coluna de afinidade Ni-NTA-Agarose, previamente equilibrada com tampão 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 0,5 M de NaCl, 5 mM de B. mercaptoetanol, 5 mM de imidazol e 8 M de uréia. Em A, estão as proteínas que não se ligaram na resina; em B, fração obtida após lavagem da coluna com tampão de lavagem (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 6.3). Em C a proteína purificada, a qual foi eluída em tampão 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 4.5 e em D, perfil das proteínas totais da fração solubilizada dos corpúsculos de inclusão antes da purificação. A coloração do gel foi feita com Coomassie Blue G-250. **M** representa o marcador de massa molecular de proteínas de 12 a 225 kDa. 74
- Figura 28.** Resultado de *Western Blotting* realizado com anticorpos policlonais anti-PLA1

natural (fração eletroforética protéica) mostrando o reconhecimento da PLA1-Rec proveniente da fração solubilizada dos corpúsculos de inclusão, demonstrando a especificidade destes anticorpos.

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Sequência de iniciadores utilizados.	32
Tabela 2.	Condições utilizadas para a obtenção do cDNA completo do alérgeno PLA1.	33
Tabela 3.	Iniciadores de expressão desenhados com base na sequência completa de cDNA de PLA1 de <i>P. paulista</i> .	37
Tabela 4.	Regiões previstas como epitopos na proteína alergênica PLA1 do veneno de vespa <i>P. paulista</i> de acordo com análise realizada pelo servidor <i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i> . Os aminoácidos que estão em letra minúscula, apresentam acessibilidade pelo anticorpo menor que 25%.	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Grupo Aculeata

O grupo Aculeata (Ordem Hymenoptera, Subordem Apocrita) abrange cerca de 50 mil espécies, das quais 10 a 15 mil são formigas, 10 mil são abelhas, e as restantes vespas (EVANS; WEST-EBERHARD, 1970). Apenas nos Hymenoptera são encontrados insetos com ferrão verdadeiro que é derivado de um ovipositor nas fêmeas, o qual permite a perfuração da pele do hospedeiro e é utilizado como uma arma para ataque e defesa (RICHARDS; DAVIES, 1984).

Insetos de grande importância médica fazem parte desta ordem e em geral pertencem às famílias Vespidae (vespas), Apidae (abelhas) e Formicidae (formigas) (CASTRO, 2001).

Apesar de existirem cerca de 500 espécies de vespas no Brasil e os acidentes com ferroadas serem freqüentes, o que revela grande importância sob o ponto de vista médico, ainda pouco se sabe sobre a composição de seus venenos.

1.2 Acidentes com Hymenoptera sociais

Estudos revelam que acidentes com ferroadas de Hymenoptera são freqüentes, devido ao fato desses insetos construírem seus ninhos próximos a áreas urbanas. Essa intensa convivência com o homem leva a ocorrência de várias ferroadas quando este representa um perigo as suas colônias (MANZOLI-PALMA; PALMA, 1992).

Em um levantamento de acidentes com himenópteros registrado no Hospital das Clínicas em São Paulo, foi observado que as vespas foram responsáveis por aproximadamente 32,6% dos acidentes, seguidas das abelhas com 28,2% e as formigas 26,8% (SOUZA, 2002).

As ferroadas causam diversas reações, sendo as mais freqüentes, edema local, rubores e dor. Ainda outros eventos podem ocorrer tais como urticária, pruridos locais, náuseas, vômitos, diarréias, angioedema, tontura, dores abdominais e falta de memória. No caso de múltiplas ferroadas, pode ocorrer reação tóxica ocasionando falta de ar e perda de consciência (HEINIG et al., 1988). Em alguns casos, foram relatadas ocorrências de hemólise intravascular, inflamação hepática aguda, trombocitopenia, falência renal aguda, seguida de necrose tubular também

aguda, paradas cardíacas e respiratórias e infarto do miocárdio (SHILKIN et al., 1972; BOUSQUET et al., 1984).

Dependendo de uma resposta intrínseca de cada vítima e da dosagem do veneno injetado, podem ocorrer sérias manifestações tóxicas e alérgicas (HOFFMAN, 1977). As reações alérgicas a ferroadas destes insetos podem vir acompanhadas de choques anafiláticos que, segundo análises feitas por Pastorello et al. (1997), correspondem a cerca de 3% da mortalidade na população alérgica ao veneno de Hymenoptera, causando até 40 mortes anuais nos Estados Unidos (BARNARD, 1973).

Pelo fato de existirem muitas pessoas sensíveis aos venenos de Hymenoptera e, devido ao grande número de acidentes de importância médica, a sensibilidade na população está estimada entre 9.3% e 28.5% (GOLDEN, 1997; ANTONICELLI et al., 2002). Estudos realizados em países europeus apontaram que 20% das vítimas apresentavam sintomas alérgicos locais, 15%, reações sistêmicas e 17% eram assintomáticas, porém estas eram positivas para testes de IgE específica, pressupondo que numa próxima ocorrência de ferroadas estariam dispostas a desenvolver reações alérgicas (NITTNER-MARSZALSKA et al., 2004).

1.3 Componentes do veneno

Estudos comprovam que os venenos de himenópteros sociais são ricos em peptídeos biologicamente ativos, que apresentam atividades farmacológicas; amins biogênicas, enzimas e proteínas, com atividades alergênicas, sendo responsáveis pelas dores prolongadas, edemas e pelas reações alérgicas e sistêmicas (LORENZI, 2002).

Os venenos das vespas são muito ricos em agentes neurotóxicos, hemolíticos e cininas, as quais são caracterizadas como componentes neurotóxicos e causadores de dores que agem no gânglio nervoso, envolvido na locomoção e, por este motivo as vespas solitárias ferroam suas presas, com o objetivo de imobilizá-las (PIEK et al., 1985; SCHMIDT, 1982).

Os principais alérgenos encontrados nos venenos de insetos sociais são: fosfolipases A1 e A2, hialuronidases, esterases, fosfatases ácidas, antígeno 5 (KING et al., 1996) e também as proteases (MC NAIRY et al., 2000). Esses componentes ficam armazenados nos reservatórios ou sacos de venenos na forma de moléculas

precursoras de alta massa molecular, quando, por mecanismos ainda não esclarecidos, se tornam maduros (GMACH; KREIL, 1995).

Estima-se que cerca de 1500 ferroadas seriam necessárias para injetar uma dose letal de veneno num adulto de 70 Kg (GODDARD, 2003). Os vespídeos injetam uma quantidade de veneno pequena, cerca de 10 µg, entretanto, uma só ferroadada pode causar sérias reações alérgicas nos indivíduos hipersensíveis (KING et al., 1996).

As reações alérgicas causadas pelos venenos de insetos, são o resultado da combinação dos alérgenos com mastócitos e anticorpos IgE, causando uma cascata de liberação de mediadores como histamina, leucotrienos, enzimas, peptídeos e ativador de plaquetas, os quais, desencadeiam diversos efeitos (HOFFMAN, 1996). Os estudos moleculares que identificam os epítomos imunogênicos dos alérgenos são muito importantes, pois localizam as regiões da molécula do alérgeno, que interagem com os anticorpos da pessoa sensibilizada (BREITENEDER et al., 1999).

Um elevado grau de reatividade imunológica cruzada tem sido demonstrado entre os alérgenos dos venenos de Hymenoptera (LU et al., 1995; KUBELKA et al., 1995). Os diagnósticos de reações alérgicas são baseados na detecção de IgE específica ao veneno na pele e/ou sangue do paciente alérgico mas, às vezes, eles são dificultados por respostas positivas que podem surgir ou da verdadeira sensibilização específica ao veneno de um determinado inseto ou como consequência de reatividade cruzada em direção a alérgenos de diferentes venenos que possuem conformações similares dos epítomos de células B (MULLER, 2002).

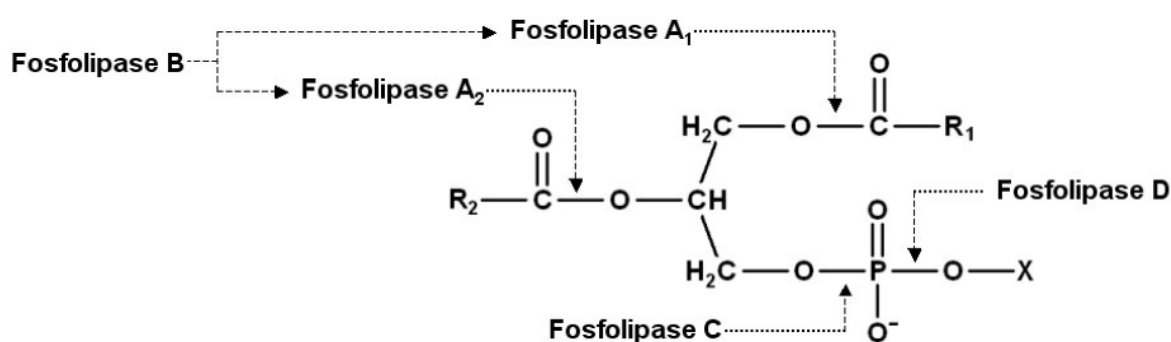
1.4 Fosfolipases

Fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfolipídios, gerando produtos bioativos, que agem como solubilizadores de membrana, cofatores enzimáticos ou como segundo mensageiro. Os fosfolipídios são construídos sobre uma cadeia de glicerol ou de esfingosina, constituinte dos esfingolipídios, que representam uma classe de lipídios de membranas celulares em que o fosfolipídio esfingomielina está incluído (RADIN, 2003).

Em eucariotos superiores, ácidos graxos saturados e insaturados, são esterificados nas posições *sn*-1 e *sn*-2 do glicerol, respectivamente. A posição de clivagem na cadeia de glicerol identifica a família da fosfolipase e gera produtos originais, dos quais muitos agem como segundo mensageiro na função fagocítica,

como o ácido araquidônico liberado pela fosfolipase A2 (PLA2) e o trifosfato de inositol (IP3), liberado pelo fosfatidil-inositol, específico da fosfolipase C (PI- PLC) (BRINDLEY et al., 2002).

As fosfolipases podem ser classificadas quanto à ligação clivada em seus substratos, dando origem a cinco grandes famílias: fosfolipases A1, fosfolipases A2, fosfolipases B, fosfolipases C e fosfolipases D (**Figura 1**).



X: álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidilglicerol

R₁ e R₂ : cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos

Figura 1: Sítios de ação de fosfolipases sobre glicerofosfolídeos. Retirado de Oliveira (2006).

A enzima fosfolipase A1 (PLA1), amplamente distribuída em diversos tecidos e organismos possui importante função fisiológica na hidrólise de glicerofosfolídeos, além de possuir importante interesse do ponto de vista industrial, devido a produção de 2- acilfosfolídeos de elevado valor comercial. Já os lisofosfolídeos resultantes da ação da PLA1 possuem propriedades emulsificantes e desempenham grande importância para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos (SONG; RHEE, 2001).

As fosfolipases A2 podem ser divididas em cinco grupos principais: as Ca^{2+} dependentes - PLA2 secretórias (sPLA2), citosólicas (cPLA2), acetilhidrolases fator de agregação plaquetária (PAF-AH) e as lisossômicas, e as Ca^{2+} independentes, todas elas divididas de acordo com o mecanismo catalítico e suas características funcionais e estruturais. As PLA2 secretórias foram subdivididas em quatorze grupos, de acordo com o número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto, sendo que as PLA2 dos venenos de serpentes estão incluídas nos grupos I e II (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Essas enzimas são pequenas, com

massa molecular variando de 13 a 18 kDa, e causam destruição celular pela interferência nos processos fisiológicos normais da vítima (KINI, 2003).

As fosfolipases A2 catalisam a hidrólise da posição *sn*-2 dos glicerofosfolípidios de membrana, produzindo 1- acilfosfolípidios e ácidos graxos livres. Quando o ácido graxo gerado é o ácido araquidônico, representa importante reação, já que este é convertido por enzimas metabólicas em vários compostos bioativos, como as prostaglandinas e os leucotrienos. Outros produtos da reação, como por exemplo, o ácido lisofosfatídico e a lisofosfatidilcolina também são importantes compostos reativos, sendo precursores de outros mediadores bioativos tais como o fator de ativação plaquetária (PAF) (KUDO, 2004). Estudos indicam que a PLA2 também possui função na apoptose, homeostasia de Ca^{2+} e isquemia miocardial (MURAKAMI, 2004).

As fosfolipases B são capazes de realizar a clivagem das ligações *sn*-1 e *sn*-2 de glicerofosfolípidios, apresentando ação fosfolipídica e lisofosfolipídica. Chen et al. (2000) descreveram em fungos a atividade tipo fosfolipase-transacilase dessa enzima, sendo considerada como fator de virulência para organismos patogênicos. Desta forma as PLAB apresentam três atividades enzimáticas: fosfolipídica, lisofosfolipídica e transacilica em uma única proteína. Mas ainda não é possível saber qual dessas atividades é a mais importante para a ação patogênica (GANENDREN et al., 2006).

As fosfolipases C são compostas por uma família de fosfodiesterases, importantes no metabolismo de fosfolípidios inositólicos e tem como substrato fosfatidilinositol 4,5- bifosfato [PI(4,5)P₂], gerando dois produtos intracelulares: inositol 1,4,5-trifosfato (InsP₃), um reconhecido mensageiro mobilizador de cálcio, e diacilglicerol (DAG), um ativador da quinase C (REBECCHI; PENTYALA, 2000). As fosfolipases C desempenham importante papel no mecanismo de sinalização celular em mamíferos e apresentam função reconhecida na ação de muitos hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento (HARDEN; SONDEK, 2006).

As fosfolipases D foram descritas pela primeira vez em 1947, por Hanahan e Chaikoff em extratos de cenoura. Hoje são encontradas em diversos organismos como vírus, bactérias, fungos, plantas e animais. Em mamíferos são encontradas na maioria das células, exercendo atividade regulatória sobre o citoesqueleto, além de estarem envolvidas nos processos de sinalização celular e no tráfego vesicular associado à secreção e à endocitose (JENKINS; FROHMAN, 2005).

Entre os alérgenos de veneno dos Hymenoptera sociais (abelhas, formigas e vespas) podem ser encontradas dois tipos de fosfolipases: A1 (PLA1) e A2 (PLA2).

Em venenos de abelhas *Apis mellifera*, as fosfolipases A2 representam 12 % de sua composição (REISMAN; LIVINGSTON, 1989) e são as enzimas mais ativas entre as conhecidas. As PLA2 também são encontradas nos venenos das cobras *Naja nigricollis*, *Naja naja atra* e no veneno da *Vespa basalis*. Por outro lado, as fosfolipases do tipo A₁ são mais comuns nos venenos de vespas sociais e formigas (NAKAJIMA et al., 1985). De acordo com King et al. (2003), em veneno de vespas, a ação da fosfolipase A1, nas repostas associadas aos processos inflamatórios, é potencializada com a degranulação de mastócitos, por um mastoparano (MCD), enquanto que, em veneno de abelhas a fosfolipase A2 age em sinergismo com o peptídeo melitina (PIEK, 1985).

Um estudo realizado por OLIVEIRA e PALMA, (1998) evidenciou que o veneno bruto da vespa social *Polybia paulista* também apresentava atividade de PLA2, a qual é dependente de cálcio, e apresenta alto potencial de hemólise em “hemácias lavadas” de ratos Wistar, quando comparada com a atividade hemolítica causada pelas PLA2 de *Apis mellifera*, das cobras *Naja nigricollis*, *Naja Naja atra* e com a toxina letal da *Vespa basalis* (NAKAJIMA et al., 1985). Talvez por serem bastante variáveis, poucas seqüências completas de DNA ou cDNA ainda estão disponíveis no GeneBank para as fosfolipases de vespas.

Santos et al., (2007) constataram a presença de PLA1 no veneno de *P. paulista*, e a caracterizaram bioquímica, funcional e estruturalmente. Demonstraram a existência de diferentes isoformas para esta enzima, indicando que a purificação de uma isoforma específica seria quase que impossível devido às similaridades bioquímicas e físico-químicas. Segundo os autores, a existência de várias isoformas pode ser um mecanismo de atribuição de diferentes funções a mesma enzima durante os envenenamentos.

As fosfolipases de veneno induzem o síntese de IgE específica e agem sinergisticamente com outras toxinas, causando efeitos farmacológicos como a hipotensão, podendo inibir a coagulação sanguínea e o aumento da permeabilidade vascular (NAKAJIMA, 1985; REISMAN; LIVINGSTON, 1989, HO et al., 1994).

Yang et al., (2008) estudaram os efeitos da PLA1 do veneno de vespas *Magnifica* (Smith), sobre a agregação plaquetária, trombose e vaso constrição, encontrando forte agregação plaquetária em concentrações nanomolares. Apenas

18 nM de PLA1 pura foram capazes de causar 85% de agregação de plaquetas em 60 segundos. Foi o primeiro relato de que PLA1 de vespas pode induzir agregação plaquetária, uma vez que os estudos eram feitos apenas focando as atividades antialérgicas ou a atividade da PLA2.

Estudos demonstram que apesar de limitadas informações sobre a origem molecular e bioquímica das isoformas de PLA1, elas podem estar envolvidas na liberação e indução de mediadores associados às células T *helper*2, mastócitos e macrófagos e, possivelmente também a outras células apresentadoras de antígenos (KING et al., 2001). Em geral, PLA1 de venenos de vespas apresentam níveis variáveis de IgE com reatividade cruzada, sugerindo a existência de múltiplos determinantes antigênicos (KING et al., 1996).

Embora as fosfolipases de vespas e abelhas apresentem algumas similaridades estruturais, os dados da literatura demonstram que não há ocorrência de imunoreatividade cruzada, entre as PLA1 e PLA2 destes venenos. As reatividades cruzadas entre as fosfolipases de mesmo tipo (entre as PLA1 ou entre as PLA2) geralmente seguem o padrão filogenético, sendo que, evolutivamente, as famílias mais próximas apresentam maior similaridade de seqüências, e assim, maior reatividade cruzada entre elas do que entre as mais distantes (HOFFMAN, 2006).

1.5 Clonagem e expressão heteróloga em *Escherichia coli*

Bactérias *E. coli* tem sido muito utilizadas em estudos de clonagem gênica, por se tratar de uma bactéria bem conhecida e cujo genoma já foi seqüenciado, por apresentar níveis de expressão protéica elevados e acúmulo rápido de biomassa e por ter um crescimento em meios de cultura de baixo custo (BANEYX; MUJACIC, 2004; WALSH, 2004). A expressão de alérgenos recombinantes em *E. coli*, apresenta, além disso, vantagem sobre os riscos oriundos dos cultivos com microorganismos patogênicos. Entretanto, deve ser levado em conta que, no processo de expressão em bactérias, pode ocorrer enovelamento incorreto das proteínas recombinantes e as modificações pós-traducionais estão ausentes. Esses eventos podem ou não interferir na caracterização imunológica do alérgeno recombinante, conforme têm sido demonstrado em muitos trabalhos (FARRELL et al., 1995).

As expressões de proteínas recombinantes eucarióticas em células de organismos procarióticos necessitam de modificações pós-traducionais para

atingirem a conformação igual à nativa. Este processo não ocorre em células procarióticas, pois a condição conformacional e a maquinaria de ligação das proteínas são diferentes, levando a um acúmulo destas em agregados insolúveis, conhecidos como corpúsculos de inclusão (JEVSEVAR et al., 2005). Além disso, o uso de fortes promotores e altas concentrações de indutores levam a uma super expressão protéica, que muitas vezes pode exceder 50% do total de proteínas bacterianas (BANEYX; MUJACIC, 2004).

Proteínas biologicamente ativas e com dobramentos corretos podem ser obtidas a partir destes corpúsculos de inclusão desde que sofram completa desnaturação. A solubilização ocorre com a ajuda de agentes desnaturantes como a uréia e o cloreto de guanidina que promovem um desdobramento completo ou parcial na estrutura protéica que pode ser renaturada com a troca de tampões diminuindo gradativamente a concentração do desnaturante (JEVSEVAR et al., 2005; TSUMOTO et al., 2003).

Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar a formação destes agregados protéicos: expressão em baixas temperaturas (CHALMERS et al., 1990; VASINA; BANEYX, 1997; BANEYX; MUJACIC, 2004), diminuição da concentração de indutores (BANEYX; MUJACIC, 2004) e coexpressão de chaperonas moleculares (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). A expressão protéica em corpúsculos de inclusão embora resulte em passos adicionais no processo de purificação, também apresenta algumas vantagens como o alto grau de pureza, a facilidade de expressar proteínas tóxicas em *E. coli*, devida a ausência da atividade biológica e a proteção das degradações proteolíticas, permitindo alta produção protéica (CHOI et al., 2006).

A escolha de um sistema de expressão adequado dentre tantos disponíveis é de suma importância na produção das proteínas recombinantes de interesse.

1.6 Imunoterapia (IT)

Segundo a Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia – ASBAI – a imunoterapia é uma forma de tratamento que vem sendo utilizada há mais de 50 anos em pessoas que desenvolveram alergias a determinadas substâncias, a fim de diminuir a sensibilidade. O paciente recebe doses crescentes do alérgeno ao qual é sensível por um período de tempo que pode variar de 3 a 5 anos. A IT induz uma série de alterações na resposta imune que estão associados à melhora clínica.

A IT veneno-específica reduz o risco de reações sistêmicas após ferroadas de insetos em pacientes sensibilizados, com eficácia de 95 a 97%, tendo como principal objetivo prevenir reações fatais e melhorar a qualidade de vida, aliviando a ansiedade relacionada a ferroadas de inseto (VARALDA, CASTRO, 2011).

Alergias a ferroadas de Himenópteros e IT veneno-específica representam um excelente modelo de estudo para mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento de tolerância imunológica em indivíduos sensibilizados. Altas doses de exposição a veneno de abelhas em apicultores representam um ótimo modelo para entender os mecanismos de tolerância das células T reguladoras em indivíduos saudáveis (OZDEMIR et al., 2011).

Em alguns países, o medo dos efeitos colaterais da IT veneno-específica levou a normas rígidas impedindo uma utilização mais generalizada deste tratamento (MOSBECH; MULLER, 2000), porém atualmente, os diferentes esquemas de tratamento variando o tempo e as doses de aplicações do alérgeno-específico tem diminuído os índices de efeitos colaterais, além de oferecer uma proteção de 83% a 95% às pessoas com história de reação anafilática após uma picada de inseto (STURM et al., 2002).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Sendo a fosfolipase A1 um dos alérgenos mais abundantes e potentes do veneno de vespas Hymenoptera, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Contribuir para a melhoria dos diagnósticos à alergia ao veneno da vespa *P. paulista*, trazendo mais informações sobre a ocorrência de imunoreatividade cruzada com os venenos de diferentes espécies de vespas;
- Abrir perspectivas de utilização do alérgeno recombinante PLA1-Rec em testes de diagnósticos, bem como na imunoterapia (IT) alérgeno-específica.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a sequência de cDNA do alérgeno fosfolipase A1 do veneno de *P. paulista*;
- Obter o alérgeno fosfolipase A1, na forma recombinante, através do sistema de expressão em bactérias *E. coli*;
- Testar e comparar a identidade imunológica dos anticorpos policlonais anti-PLA1 natural de *P. paulista* contra o próprio componente presente no extrato de veneno bruto desta vespa;
- Analisar a ocorrência de reação imunológica cruzada dos anticorpos policlonais contra o veneno bruto de outros insetos sociais.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Após a identificação morfológica de algumas vespas de *P. paulista* obtidas em ninhos dos municípios de Rio Claro e Santa Gertrudes, foi feita a coleta destes ninhos bem como de outros insetos sociais a serem utilizados no decorrer do trabalho. As vespas de *P. paulista* foram transportadas ainda vivas para o laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes (LBMA) do Departamento de Biologia - IB/UNESP/Rio Claro/SP. Após serem submetidas à analgesia por alguns minutos a -20°C, tiveram suas glândulas de veneno retiradas com auxílio de pinças de ponta fina, e imediatamente utilizadas para a extração de RNA, ou estocadas a -20°C, até o momento de uso, para a preparação de extratos protéicos.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de RNA

O RNA total da glândula de veneno de *P. paulista* foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies, Cat. n° 15596-026), utilizando-se material fresco (no momento da coleta) ou com glândulas maceradas em TRIzol® e estocadas por 7 dias a -85°C.

A concentração do RNA total foi determinada pela razão de absorbância 260/280nm do material (diluído a 1: 500 em H₂O-DEPC) e, a integridade do RNA foi determinada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) (SAMBROOK *et al.*, 2001). O RNA obtido foi visualizado pela coloração das amostras com Blue Green 1X (1:5; v/v; corante: amostra) em transiluminador UV- LBT ST (Loccus Biotecnologia).

3.2.2 Síntese de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada por RT-PCR (Transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase) com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega®, Cat. n° A3800) com 1µg de RNA total, juntamente com o iniciador oligo dT- Adapter (**Tabela 1**) sintetizado pela Gibco®-Life Technologies de acordo com as orientações do fabricante.

3.2.3 Iniciadores gene – específicos

Com base nas seqüências de cDNA, depositadas no GenBank sob os nº de acesso EF101736.1 e AM491805.1 (SANTOS, 2007) foram sintetizados os iniciadores direto e reverso (**Tabela 1**) para a forma madura da proteína PLA1. Além disso, foi utilizado o iniciador AMP, que se anela à região adaptadora adicionada no terminal 3' de todas as moléculas de cDNA sintetizadas, permitindo desta forma, a obtenção das seqüências finais dos genes de interesse, quando utilizado em associação com um iniciador gene - específico direto.

Tabela 1: Sequência de iniciadores utilizados.

Iniciadores	Sequências (5'- 3')
Oligo dT Adapter	5' GGC CAC GCG TCG ACT AC (T)₁₇ 3'
PLAF	5' GGC CTG ATT CCG GAA TGC CCG TTT AAC GAA TAT G 3'
PLAR	5' TTA CAG TTT AAT GCC TTC GTT ATG GCA ATA CGG CGC G 3'
AMP	5' GGC CAC GCG TCG ACT AC 3'
Sequência de iniciadores do vetor pCR®/GW/TOPO® (5'- 3')	
GW1F	5' GTT GCA ACA AAT TGA TGA GCA ATG C 3'
GW2R	5' GTT GCA ACA AAT TGA TGA GCA ATT A 3'

3.2.4 Amplificação de cDNA gene – específico de PLA1

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas com a enzima Platinum® Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen™, Cat. nº 10966-018) em um volume final de 25 µL, sendo as concentrações finais na reação: 1U de Taq DNA polimerase, 0.2 mM de cada nucleotídeo, 2.0 mM de MgCl₂, 0.4 µM de cada um dos iniciadores direto, reverso e AMP e cerca de 2 µg de cDNA, completando com água MQ estéril. Para a otimização das reações foram testados os parâmetros de temperatura de anelamento de todos os iniciadores (47°C–58,5°C) e quantidades de iniciadores (0.2-0.4µM). As reações foram incubadas em termociclador Eppendorf Mastercycler ep gradient sob as condições abaixo (**Tabela 2**).

Tabela 2: Condições utilizadas para a obtenção do cDNA completo do alérgeno PLA1.

PCR		
Denaturação Inicial	95° C	5 min.
40 ciclos		
Denaturação	95° C	1 min.
Anelamento	57,5° C	1 min.
Extensão	72° C	3 min.
Extensão Final	72° C	15 min.
4° C ∞		

Após a amplificação, nos mesmos tubos da reação foram adicionadas mais 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™, Cat. n° 10342-053) sem atividade revisora e a reação foi incubada a 72 °C por mais 10 min para adição de uma cauda poli-A na extremidade 3', a fim de facilitar o processo de clonagem.

O produto de amplificação foi analisado paralelamente a uma mistura padrão de DNA (ladder) de fragmentos diferentes entre si por 100 pb, através de eletroforese em gel de agarose a 1.5 % em TAE 1X e, a visualização foi realizada sobre luz UV com o uso do *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, Cat. n° 13-15009-06^a), na proporção de 1:3 (Blue Green: amostra; v:v). O fragmento obtido foi cortado do gel e purificado.

3.2.5 Purificação do produto de PCR a partir de gel de agarose

Este procedimento foi realizado usando o kit “Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare®, Cat. n° 28-9034-70) conforme o protocolo sugerido pela empresa. O DNA foi extraído do gel e solubilizado em tampão fornecido pelo kit, na temperatura de 60°C por 5 minutos. A solução resultante foi então aplicada em uma resina, ligante-específica para adsorção apenas de moléculas de DNA com tamanho variando entre 100 pb e 10 kb. A resina foi lavada e o DNA eluído em um novo tubo. Parte da amostra purificada foi visualizada, em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, a uma voltagem de 50 volts.

3.2.6 Clonagem para amplificação do cDNA de PLA1

3.2.6.1 Reação de ligação

Os produtos de PCR PLA1 gene-específico foram clonados no vetor pCR®8/GW/TOPO® (kit pCR®8/GW/TOPO® Cloning kit Cat. nº K2520-20 do sistema Gateway Invitrogen), segundo o protocolo de reação sugerido pelo fabricante. As reações de ligação foram realizadas na proporção de 1:3 (ng de vetor: ng de inserto) utilizando-se 3 µL do produto purificado, 1 µL do vetor, 1 µL de solução salina e água (ambos do kit) suficiente para 6 µL finais de reação. As reações foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente, e deixadas overnight a -20°C para melhorar a eficiência do processo de ligação.

3.2.6.2 Transformação

As reações de ligação foram utilizadas para as transformações das bactérias-*E. coli* One Shot® Mach1™T1^R, quimicamente competentes, que acompanham o kit especificado acima de acordo com o protocolo prescrito pelo fabricante. Detalhadamente, 2 µL das reações de ligação foram incubadas com 50 µL da suspensão de bactérias, por 20 minutos no gelo, antes do choque térmico das amostras, de 30 segundos a 42°C seguido de gelo novamente. A cada reação foram adicionados 250 µL do meio SOC estéril (20 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 0,5g/L de NaCl, com adição de 0,01M de MgCl₂, 0,01M de MgSO₄ e 0,04% de glicose estéreis) à temperatura ambiente. Os tubos *ependorf* foram colocados na horizontal em incubadora por 1 hora a 37°C, com agitação de 220 rpm, e a seguir, diferentes volumes destas suspensões (50 a 120 µL) de bactérias transformadas foram aplicados em placas de Petri com meio Luria-Bertani agar (Tryptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0% pH 7,0), contendo espectinomicina a 100 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por no mínimo 18h para crescimento bacteriano.

3.2.6.3 Extração de DNA plasmidial (“minipreps”)

As extrações de DNA plasmidial TOPO/GW-PLA1Rec foram feitas com o kit QIAprep® Spin miniprep (Qiagen, Cat. nº 27104); conforme instruções do protocolo. Para isso, as culturas foram crescidas em 3 mL de meio líquido LB - espectinomicina a 100 µg/mL com agitação de 220 rpm, a 37°C, durante 17 horas.

3.2.6.4 Análise de restrição

Alíquotas de 5 µL das preparações plasmidiais recombinantes TOPO/GW-PLA1rec foram utilizadas em reações de restrição com a enzima *EcoRI*, em um volume final de 20 µL contendo: 2 U da enzima *EcoRI*, tampão *EcoRI* 1X e H₂O MQ. As reações foram incubadas por 3h a 37°C e após esse período analisadas em gel de agarose 1,5% em TAE 1X, visualizados no gel pela coloração da amostra com Blue Green, sob a ação de luz UV.

3.2.6.5 Sequenciamento dos plasmídeos TOPO/GW-PLA1Rec

O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizado em colaboração com o Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, UNESP – Rio Claro - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- em seqüenciador *Applied Biosystems* 3737.

Para as reações de sequenciamento foram utilizados os iniciadores direto e reverso do vetor pCR®8/GW/TOPO® além dos iniciadores específicos já descritos anteriormente neste trabalho (**tabela 1**).

3.2.6.6 Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram analisadas pelos programas: BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) - NCBI, DNASTAR - Lasergene® SeqMan Pro™, BCM Search Launcher – Six Frame Translation of sequence (SMITH et al.,1996) e Multaling (CORPET, 1988) de forma a:

- a) checar a qualidade das seqüências;

b) obter o consenso entre as seqüências diretas e reversas, encontradas para o mesmo fragmento, por meio do alinhamento entre elas;

c) realizar as pesquisas de similaridade entre as seqüências de bases e de aminoácidos encontradas e as descritas no GenBank. Além disto, foram também pesquisados os possíveis domínios protéicos existentes no fragmento obtido, os quais foram comparados aos demais já disponíveis em banco de dados.

3.2.7 Obtenção de bactérias *E. coli* BL21- DE3, XL1-Blue e DH5 α competentes

Para cada uma das cepas bactérias foram preparadas duas placas de Petri contendo meios de cultura específicos. As células DH5 α , utilizadas para ampliações do vetor de expressão pET-28a, foram crescidas em meio LB-agar sem antibiótico. A cepa XL1-Blue, para amplificação das construções pET-28a_PLA1, cresceram em meio LB-agar/canamicina a 25 $\mu\text{g/mL}$, a cepa BL21-DE3, responsável pela expressão protéica, foi semeada em meio LB-agar/cloranfenicol a 25 $\mu\text{g/mL}$ e em seguida todas as placas foram incubadas a 37°C durante a noite. De cada cepa bacteriana foi selecionada uma única colônia isolada, que em seguida foi crescida em 3 mL de meio LB líquido (células DH5), 3 mL de meio LB líquido com canamicina 25 $\mu\text{g/mL}$ para as células XL1-Blue e 3 mL de LB líquido com cloranfenicol para as células BL21-DE3. Estas culturas foram incubadas sob agitação de 200 rpm, a 37°C durante a noite. A seguir, parte das mesmas foi estocada em glicerol 15% (células não competentes) e 1 mL de cada meio rico em bactérias foi separadamente adicionado a frascos estéreis contendo 100 mL de meio LB (com e sem antibiótico específico, dependendo da cepa) e incubados por aproximadamente 3 horas a 37°C sob agitação de 250 rpm. O crescimento das culturas foi monitorado espectrofotometricamente até que as culturas atingissem um nível de absorbância de 0,5, lidos em 600nm. O volume total dos cultivos de cada cepa (100 mL para cada uma) foi dividido em dois tubos falcon estéreis de 50 mL. Foram mantidos em gelo por 15 minutos, e em seguida centrifugados a 8.000g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados de cada cultura específica reunidos em um único precipitado, sendo que antes disto, cada um passou por processos de lavagem e ressuspensão em 10 mL de CaCl₂ 0,1M gelado, e a seguir deixados em gelo. As células foram centrifugadas mais uma vez a 4°C por 10 min a 8.000g e os sobrenadantes descartados, os tubos foram mantidos

invertidos por 1 min. Os precipitados foram ressuspensos em 2 mL de uma solução de CaCl_2 (0,1 M) gelado contendo 15 % de glicerol e o volume total foi aliquotado e armazenado a -85°C para uso posterior.

3.2.8 Transformação das células DH5 α para Amplificação do vetor de expressão pET-28a

Em um tubo contendo 200 μL de células DH5 α competentes foram adicionados 2 μL (100 ng) do plasmídeo pET-28a e mantidos em gelo. Em seguida a mistura foi submetida a um choque térmico de 42°C por 90 segundos e retornada ao gelo por mais 2 minutos. À suspensão foram adicionadas 800 μL de meio LB líquido e submetida à agitação a 100 rpm a 37°C por uma hora. Diferentes volumes da transformação foram plaqueados em meio LB-agar/canamicina a 25 $\mu\text{g/mL}$ e deixadas em estufa a 37°C por aproximadamente 20 h. As melhores colônias foram selecionadas para os experimentos, e os DNAs plasmidiais foram extraídos como descrito no item 3.2.6.3.

3.2.9 Desenho dos iniciadores para expressão da PLA1-Rec

A partir da sequência completa de cDNA da PLA1 do veneno da vespa *P. paulista*, foram desenhados os iniciadores específicos para expressão no vetor pET-28a, contendo o sítio da enzima *NdeI* no iniciador direto e o sítio da enzima *EcoRI* no iniciador reverso, ao qual ainda foi adicionado o códon de terminação TAA* (Tabela 3). Os iniciadores foram desenhados de forma a amplificar a sequência inteira de PLA1 a ser expressa em “frame +1” e com o vetor contendo uma cauda de seis Histidinas no NH_2 terminal.

Tabela 3. Iniciadores de expressão desenhados com base na sequência completa de cDNA de PLA1 de *P. paulista*.

Iniciadores	Sequências dos Iniciadores (5'-3')
PLA1_expF (Direto)	5`CTT A <u>CATATG</u> CTG ATT CCG GAA TGC CCG TTT AAC 3` Sítio de <i>Nde I</i>
PLA1_expR (Reverso)	5`AGT G <u>GAATTC</u> TTA*AAG TTT AAT GCC CTC GTT ATG ACA ATA AG 3` Sítio de <i>EcoR I</i>

3.2.10 Uso dos iniciadores de expressão para a amplificação do cDNA de PLA1 de *P. paulista* e clonagem em vetor pCR[®]8/GW/TOPO[®]

As amplificações por PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, a partir de 1.0 µM de cada um dos iniciadores direto e reverso (**Tabela 3**), 2.5 U de Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Qiagen, Cat. no. 202602), 0.3 µM de dNTPs, 1.0 mM de MgSO₄ e cerca de 0.5 µg de preparação plasmidial de TOPO/GW-PLA1rec. As reações foram incubadas sob as seguintes condições: Denaturação: 95°C, 5 min; 40x [Denaturação: 95°C, 1 min; Anelamento: 58°C, 1 min; Extensão: 72°C, 3 min]; Extensão final: 72°C, 15 min.

O produto de amplificação foi analisado paralelamente a um marcador de massa molecular de DNA “Ladder” de 1 kb (Norgen, Cat. no. 11900), através de eletroforese em gel de agarose a 1.5 % em tampão TAE 1X e visualizado com o uso do Blue Green Loading Dye I. O fragmento obtido de 909 pb foi cortado do gel, purificado e utilizado na reação de ligação ao vetor pCR[®]8/GW/TOPO[®] (Invitrogen, Cat. nº K2520-20), conforme orientações do fabricante. A clonagem foi realizada conforme descrito anteriormente no item **3.2.6**. Os clones positivos foram seqüenciados a fim de verificar a presença dos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *NdeI*. A extração de DNA plasmidial contendo os sítios das enzimas de restrição foi imprescindível na seleção dos clones positivos que viriam a ser utilizados para a clonagem de PLA1 em vetor de expressão. Estes clones recombinantes foram chamados de **PLA1_Rec2**.

3.2.11 Dupla digestão do vetor pET-28a e da construção plasmidial PLA1_Rec2

As preparações plasmidiais do vetor de expressão pET-28a “vazio” e PLA1_Rec2, contendo o inserto a ser expresso, foram separadamente submetidas às reações de dupla digestão com as enzimas *NdeI* (Fermentas, Cat.nº ERO581) e *EcoRI* (Fermentas, Cat. nº ERO271).

Para a reação com o pET-28a, foram utilizados 50 ng de vetor, tampão Orange 1x, 10 U da enzima *EcoRI*, 10 U de *NdeI* e água MQ para completar o volume final de 40 µL, sob incubação a 37°C por 16 horas

Paralelamente, o vetor PLA1_Rec2 numa concentração de 51 ng foi clivado com 10 U de cada uma das enzimas acima citadas, tampão Orange 1x e água MQ completando-se para um volume final de 40 µL durante o período de 3 horas à 37°C.

3.2.11.1 Desfosforilação do vetor de expressão pET-28a.

Após a digestão, o vetor foi submetido à ação da enzima CIP (fosfatase alcalina de intestino de bezerro) (New England Biolabs®, Cat. nº MO290S) para que ocorresse uma desfosforilação na região 5' a fim de evitar a religação. Para isso 2,5 U da enzima foram adicionadas no mesmo tubo onde ocorreu a digestão, incubando-se adicionalmente a reação por mais 1 hora a 37°C.

Posteriormente, estas mesmas reações foram feitas em um volume de 240 µL e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8 %. As bandas correspondentes ao pET-28a e ao inserto de PLA1 foram recortadas do gel e purificadas com o “Kit GFX™ PCR and Gel Band Purification”.

3.2.11.2 Construção do Vetor de Expressão pET-28a_PLA1 e transformação em células XL1-Blue.

O plasmídeo pET-28a e o inserto PLA1 após digestão, purificação e quantificação foram ligados, utilizando-se 54 ng do vetor, 160 ng do inserto (proporção de 1:3, vetor: inserto), além da adição de 1 U de T4 DNA ligase e do tampão de ligação 1x (Invitrogen®, Cat. nº 15224-017) num volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 4°C por 20 horas. Posteriormente, células quimiocompetentes de *E. coli* XL1-Blue, doadas pelas Profas. Dra. Lucília Domingues e Suzana M. G. Moreira da Universidade do Minho, Braga, Portugal, foram transformadas com o produto de ligação. Para isso, todo o conteúdo da reação de ligação foi adicionado em 200 µL das células previamente descongeladas em gelo. A suspensão foi mantida por 30 min em gelo, seguido por um choque térmico de 45 segundos a 42°C e novamente mantida em gelo por mais 2 min. Foram cuidadosamente adicionados à suspensão 800 µL de meio LB líquido à temperatura ambiente e as células foram incubadas por 1 hora à 37°C sob agitação de 150 rpm para crescimento. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB-agar com 50 µg/mL de canamicina e incubadas em estufa a 37°C, durante toda a noite. As reações controle da

transformação foram feitas com o plasmídeo pET-28a sem inserto e com o controle da reação de ligação.

Das placas resultantes da transformação foram selecionados 8 colônias recombinantes, as quais foram crescidas em 5 ml de meio LB líquido com canamicina a 50 µg/mL sob agitação de 200 rpm, a 37°C, durante 17 horas para extração de vetores recombinantes pET-28a_PLA1.

3.2.12 Transformação das células BL21-DE3 com pET-28a_PLA1.

Aproximadamente 50 ng de cada preparação plasmidial de pET-28a_PLA1, provenientes dos clones 1, 2, 3 e 6 foram separadas e incubadas com alíquotas de 200 µL das células BL21-DE3 quimicamente competentes. As misturas (preparadas em tubos *eppendorfs*) ficaram em repouso no gelo por 30 min, seguido pela incubação a uma temperatura de 42°C por exatamente 90 segundos e retorno ao gelo por mais 2 min. A cada uma das amostras foram acrescentadas 800 µL de meio SOC (Invitrogen®) sendo os tubos incubados a 37°C sob agitação constante de 150 rpm por 1 hora. Todo o volume de cada uma das transformações foi espalhado em placas individuais contendo LB-agar e canamicina a 50 µg/mL, as quais foram incubadas a 37° C por 16 horas.

3.2.13 Padronização das condições de expressão de PLA1_Rec (fosfolipase A1 recombinante) em pequena escala.

Pré-inoculos de 5 mL, cada um, de meio LB líquido contendo 50 µg/mL de canamicina foram feitos a partir de colônias obtidas de cada clone (1, 2, 3 e 4) de BL21-DE3 pET-28a_PLA1. As diferentes suspensões bacterianas foram crescidas por 16 horas a 37° C sob agitação de 150 rpm.

Em seguida as suspensões foram diluídas em 50 mL de LB/canamicina sob agitação constante a 37°C até atingir DO600. Neste momento, diferentes concentrações de IPTG (isopropil-b-D-tiogalactosídeo) (Qiagen, Cat. n° 129921) 0,1mM, 0,5mM e 1 mM e diferentes temperaturas (37°C, 30°C, 25°C e 20°C) foram testadas para melhor indução da expressão da proteína. Alíquotas de 1,5 mL das suspensões foram coletadas em diferentes momentos: 0h, 4h, 6h, 10h, 24h e 48h. Estas diferentes condições foram testadas para cada um dos 4 clones selecionados. Todas as amostras foram centrifugadas por 10 min à 2600xg, ressuspensas em

tampão PBS, pH 8,0, 1x e sonicadas por 2 min no sonicador Chubby (modelo GA450), com pulsos de 30 seg em 30 seg, sempre voltando as amostras para o gelo para não ocorrer denaturação protéica. Após sonicação, os tubos foram centrifugados a 4°C em 9200xg e tanto o sobrenadante (fração solúvel) quanto o precipitado (fração insolúvel) foram analisados em SDS-PAGE 15%.

3.2.14 Expressão e purificação de PLA1_Rec em maior escala.

Uma das colônias de *E. coli* BL21-DE3 contendo pET-28a_PLA1 (clone 1) foi pré-inoculada em um tubo falcon com 10 mL de meio LB/canamicina a 50 µg/mL durante 16 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm. A seguir a cultura foi diluída em 600 mL de LB/canamicina e crescida a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até atingir a densidade óptica (D.O) de 0,6 numa absorbância de 600nm. Para a indução da expressão da proteína foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM e a temperatura de crescimento diminuída a 20°C durante 6 horas. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 4°C, 10000xg por 10 min, e como a proteína apresentou-se insolúvel após a expressão, os procedimentos seguintes foram realizados sob condições desnaturantes. Desta forma, o precipitado de bactérias foi ressuspenso em 25 mL de tampão de lise desnaturante (NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0, 300 mM de NaCl, 5 mM de imidazol e 0.2 mg/mL de lisozima) incubado à 20°C sob agitação por 25 min e a seguir sonicado em gelo, com 10 pulsos de 30 seg com intervalos de 30 seg e mais uma vez de por 2 min contínuos. O extrato bacteriano foi novamente centrifugado a 15000xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante recolhido. O precipitado foi ressuspenso em 10 mL de tampão de solubilização de corpúsculo de inclusão (8 M de uréia, 0.5 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 5 mM de B. mercaptoetanol e 5 mM de imidazol). Esta suspensão foi incubada sob agitação à 8°C por toda a noite e na manhã seguinte centrifugada a 20000xg por 15 min a 4°C. A parte solúvel (do corpúsculo de inclusão) foi então submetida à leve agitação por 1 hora à temperatura ambiente com uma resina de cromatografia de afinidade carregada com Ni²⁺ (Ni-NTA-Agarose, Qiagen, Cat. n° 30210) previamente equilibrada com o tampão acima. Neste pH, esta resina tem a propriedade de promover ligações de coordenação entre às proteínas recombinantes com caudas de histidina e os cátions Ni²⁺ presentes na fase estacionaria. Logo após, o material foi transferido para uma pequena coluna e lavado com 10 volumes de tampão de

lavagem (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 6.3). A proteína de interesse foi eluída com 5 volumes de coluna do tampão de eluição (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 4.5) sendo todas as amostras das diferentes etapas de purificação analisadas em SDS-PAGE 15% e coradas com Coomassie Blue.

3.2.15 Preparação dos extratos protéicos brutos dos venenos de *P. paulista* e de outros insetos sociais (Hymenoptera).

Os reservatórios de veneno de *P. paulista* foram removidos por dissecação à baixa temperatura, rapidamente lavados em água destilada, a 4°C, e logo utilizados nos experimentos. A preparação dos extratos de veneno foi feita pela ressuspensão dos mesmos em água destilada, seguida de leve pressão com bastão de polietileno autoclavável de ponta fina, para que ocorresse rompimento, com conseqüente liberação do veneno em solução. As suspensões foram centrifugadas por 5 min, 14000xg, 4°C, sendo os precipitados descartados e os sobrenadantes utilizados como fonte de proteínas.

3.2.16 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas presentes no extrato de veneno foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976). A leitura foi feita em espectrofotômetro na faixa de 595nm de absorbância.

3.2.17 Eletroforese preparativa do veneno de *P. paulista* em gel desnaturante de poliacrilamida e imunização de camundongos BALB-C

O extrato bruto proveniente de 1000 glândulas de veneno foi submetido à eletroforese em gel preparativo de gradiente de 10-18% de poliacrilamida, preparados sob condições desnaturantes (sistema alcalino Tris-Glicina/Tris-HCl na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS), segundo Hames e Rickwood (1990) para análise e separação das proteínas do extrato de veneno.

As bandas protéicas encontradas nos intervalos de massa molecular de 12-19 KDa, similar às citadas por Santos (2007) para a PLA1 do veneno de *P. paulista* foram recortadas do gel reunidas num pool e divididas em 4 tubos *ependorf*. A cada

um dos tubos foi adicionada solução fisiológica suficiente para macerar os pedaços de géis até que se obtivesse uma suspensão homogênea. A suspensão foi usada para o inóculo em dois camundongos (BALB/C fêmea) de aproximadamente 25 g de peso cada um, nos tempos de 1, 7, 21, 28 e 30 dias. As doses injetadas foram de 0,2 mL subcutâneos em dorso. Após o trigésimo dia todos os animais foram anestesiados para a coleta de sangue por punção cardíaca. Os experimentos de imunização foram realizados no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental-LIAE- coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Outros extratos protéicos foram preparados conforme já descrito a partir do veneno bruto de *P. paulista* e de outras vespas (*Polybia sericea*, *Polybia ignobilis*, *Polistes lanio lanio* e *Agelaia pallipes pallipes*), formiga (*Solenopsis invicta*) e abelha (*Apis mellifera*) para a análise de reatividade cruzada, sendo submetidos também à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

Foram aplicadas 80 µg de proteínas totais de cada extrato/canaleta no gel e como referência, tanto para a massa molecular das bandas, bem como para a eficiência da eletrotransferência, foi utilizado um padrão pré-corado de proteínas na faixa de 12 a 225 KDa (Amersham High-Range Rainbow Molecular Weight Markers-GE Healthcare- Cat n° RPN 756E). As corridas foram realizadas a 75 V no gel de empilhamento e 110 V no gel de resolução por 2 horas.

3.2.18 Análise de Western blotting

Após coleta dos soros de camundongos, obtidos pelo inóculo da fração eletroforética protéica de PLA1 do veneno de *P. paulista* descrito no item **3.2.17**, os experimentos de *Western blotting* e imunodeteção foram realizados em nosso laboratório com base no protocolo estabelecido pelo Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental do Departamento de Clínica Médica da UNICAMP.

As proteínas separadas por SDS-PAGE 10% foram eletrotransferidas (a 0.8 mA/cm²) do gel para membrana de nitrocelulose (0,45 µ), utilizando o sistema semi-seco (eletrodos de grafite) NovaBlot Unit do aparelho Multiphor II (Pharmacia Biotech) com o tampão de transferência pH 8.3 (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, contendo SDS a 0,2% e metanol a 20%). Com base no tamanho do gel, os parâmetros de transferência ficaram ao redor de 60 V, 30-34 mA por 2 horas. A eficiência da eletrotransferência pode ser verificada pela visualização do padrão de

proteínas pré-corado transferido para a membrana e pela coloração posterior do gel transferido com Coomassie Blue G-250 a 0,2% diluído em solução de metanol 45% e ácido acético a 10%, por 20 minutos à temperatura ambiente.

3.2.19 Imunodeteção

A membrana de nitrocelulose teve seus sítios inespecíficos bloqueados por 3 lavagens de 5 minutos cada uma, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio TBS-T (tampão Tris-Cl, 1M, pH 8.0 contendo 150 mM de NaCl e Tween 20 a 0,05%) acrescida de leite em pó desnatado a 1% (m/v) por 2 horas. Logo após, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada uma, na geladeira, com a solução de TBS-T e a seguir, incubadas com a fração do soro do animal, previamente diluída (1:1000) na solução de bloqueio, sob agitação bem lenta a 4°C durante a noite. A membrana foi submetida a 3 lavagens com a solução de TBS-T e após isso foi incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, Cat n° A-3688) diluído a 1:5000 em solução de bloqueio por, 2 horas, exatamente à temperatura ambiente, sob agitação lenta e posteriormente lavado mais 3 vezes com a solução de TBS-T. A revelação do resultado foi realizada com o sistema de substratos BCIP[®]/NBT (Sigma-Aldrich, Cat n° B1911) pela incubação das membranas com 10 mL da solução à temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos.

3.2.20 Modelagem da estrutura tridimensional da PLA1

O modelo tridimensional da proteína PLA1 de *P. paulista* foi construído a partir de técnicas de homologia, baseadas em sequências de proteínas de alta similaridade e que possuam dados tridimensionais experimentais de cristalografia de raios-x depositados no PDB (Protein Data Bank). Assim, para a construção do modelo teórico da proteína em estudo, foi utilizado uma lipase pancreática de cobaias (**PDB ID: 1GPL**) em adequação às restrições espaciais da molécula, utilizando-se o programa Modeller versão 9.8 (SALI, BLUNDELL, 1993). Para visualização dos modelos foi utilizado o software PyMol Molecular Graphics System, versão 1.3 (DELANO, 2004) e a análise estereoquímica foi realizada pelo programa PROCHECK (LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 1993).

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de RNA total

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

As concentrações de RNA total obtidas em nossas preparações variaram de 2.9 a 300 ng/ μ L e a razão de pureza 260nm/280nm das amostras ficaram entre 1,4 a 2,0. Na **Figura 2**, observa-se que as melhores amostras da extração foram as amostras 2, 3, 4, 5, 7 e 8, que apresentam maior intensidade das bandas de 28s e 18s, indicando preparações de boa qualidade.

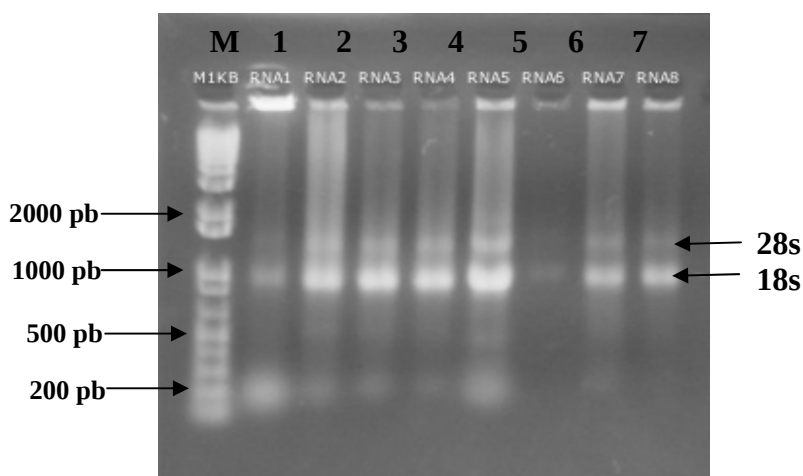


Figura 2. Perfil eletroforético de amostras de RNA total da glândula de veneno de *P. paulista*, em gel de agarose a 1%, em TAE 1X com formaldeído (Sambrook et al., 2001). Nas canaletas **2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8**, foram aplicadas, amostras de RNA referentes à extração do material depois de no mínimo, 7 dias em TRIzol a - 85°C. **M** corresponde ao DNA *ladder* de 1 kb (de 100 a 12.000 pb). Todas as amostra foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green:amostra).

4.2 Síntese do cDNA

Analisando-se os dados obtidos através do perfil eletroforético de cDNA em gel de agarose (**Figura 3**) nota-se que ocorreu a formação de “rastros” de fragmentos de cDNA num intervalo de alta massa molecular, em que as sequências de cDNA de interesse relacionadas aos genes de veneno poderiam ser encontradas.

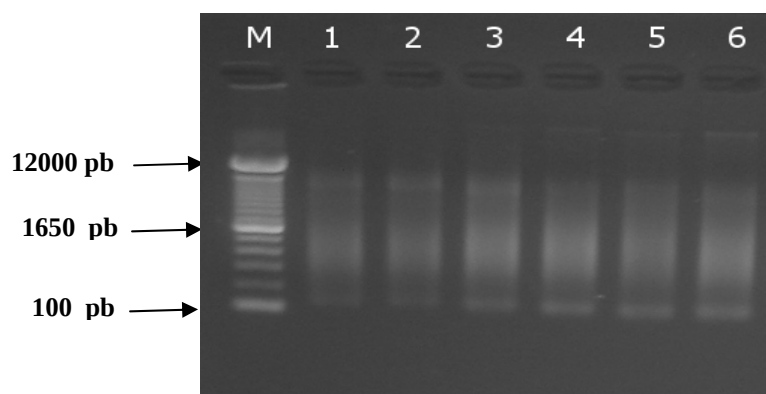


Figura 3. Perfil eletroforético de cDNA de *P. paulista*, em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X. Nas canaletas de 1 a 6 estão as amostras de cDNA sintetizadas com a enzima RT- Improm (Promega). **M** corresponde ao padrão de DNA “ladder” de 1 Kb. Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v;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

4.3 Amplificação da sequência de cDNA do gene PLA1

As melhores condições para a obtenção do cDNA completo do alérgeno PLA1 foram: (1) temperatura de anelamento de 57,5°C e (2) concentração dos iniciadores PLA1F/AMP de 0,4 μ M, usando-se uma Taq DNA polimerase de alta fidelidade. O produto esperado deveria estar em torno de 1000 pb, e uma ótima amplificação foi obtida nesta faixa de massa molecular (**Figura 4**).

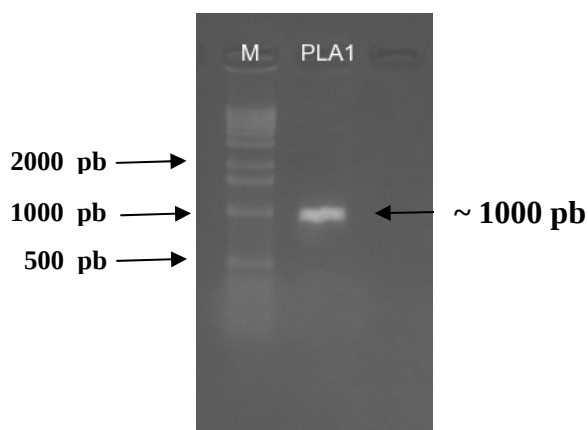


Figura 4. Banda correspondente ao fragmento de cDNA de ~1000 pb, amplificado em temperatura de anelamento de 57.5°C e concentração de 0,4 μ M de cada um dos iniciadores do par PLA1F/AMP. À esquerda, **M** refere-se ao DNA ladder de 100 pb (de 100 a 12.000 pb). A análise foi realizada em gel de agarose 1,5%, TAE 1X e a amostra visualizada com Blue Green (1:5 v/v; corante:amostra).

Após determinação das melhores condições de amplificação, as reações foram reunidas em um volume de 250 μ L (**Figura 5**), sendo a amostra final submetida à eletroforese em gel de agarose 1% e o fragmento único amplificado

recortado do gel, deixado em banho Maria a 60°C até se tornar líquido e purificado para uso na reação de ligação no vetor pCR®8/GW/TOPO®.

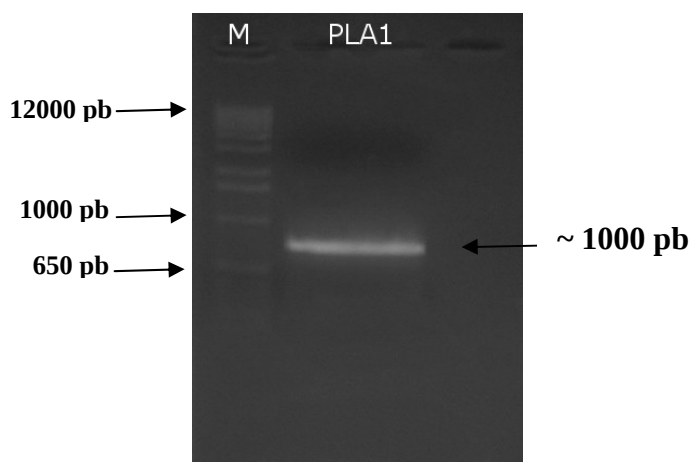


Figura 5. Fragmento, à direita, correspondente ao cDNA de PLA1 de ~1000 pb resultante da eletroforese em gel de agarose 1%, TAE 1X de grande volume do fragmento de cDNA de PLA1 para posterior eluição e purificação. À esquerda, **M** refere-se ao DNA ladder de 100 pb (de 100 a 12.000 pb). As bandas foram visualizadas com Blue Green (1:5 v/v; corante:amostra).

4.4 Clonagem de cDNA e sequenciamento dos clones

A primeira clonagem do fragmento de interesse no vetor pCR®8/GW/TOPO® - transformado em bactérias *E. coli* One Shot®Mach1™T1^R foi feita com sucesso obtendo-se 10 clones recombinantes. O DNA plasmidial de cada clone foi extraído e submetido à digestão por *EcoRI*, evidenciando um fragmento de aproximadamente 1000 pb como visto na **Figura 6**.

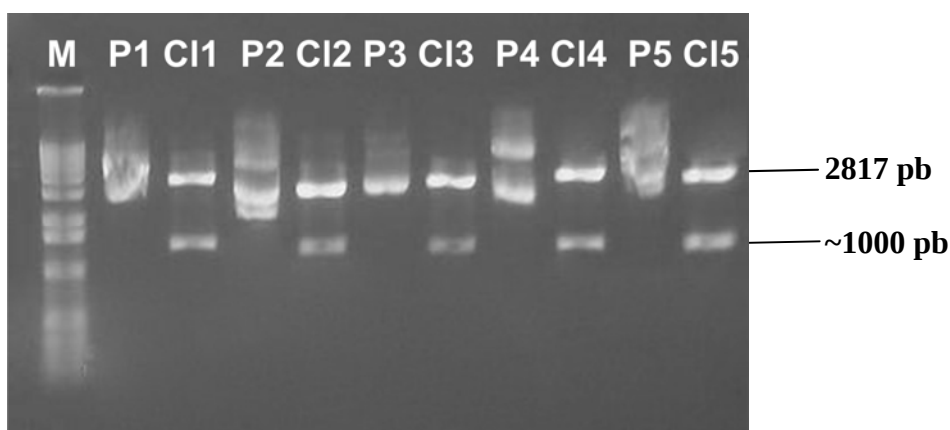


Figura 6. Resultado das análises de restrição com a enzima *EcoRI*, dos DNAs plasmidiais TOPO/GW-PLA1 recombinantes provenientes de cinco dos dez clones positivos de células *E. coli* One Shot®Mach1™T1^R, contendo o cDNA de PLA1 do veneno de *P. paulista*. As amostras foram aplicadas lado a lado: plasmídeos não clivados (**P**) e plasmídeos clivados (2817pb) mais os insertos com tamanhos de ~1000 pb (**CI**) respectivamente. As amostras foram visualizadas com Blue Green (1:5 v/v; corante:amostra).

4.5 Análises das seqüências de nucleotídeos da PLA1 de *P. paulista*.

Do sequenciamento dos 10 clones, com iniciadores do vetor pCR[®]8/GW/TOPO[®] (GW1 e GW2) e com os iniciadores específicos PLA1F/AMP, foram obtidas 20 sequencias de boa qualidade. A partir delas, **dois contigs** foram gerados pelo software “Sequence Analysis and Assembly-DNASTAR[®] - Lasergene” que resultaram em uma **única seqüência consenso** apresentada abaixo, na qual o iniciador direto (PLAF) está evidenciado em negrito e com uma seta:

>PLA1_Polybia paulista (985 pb)

```

5` GGCCTGATTCCGGAATGCCCGTTTAACGAATATGATATTTTATTTTTCGTTTACACAAGGGATAAGC
AAGATGGTATTATTCTTAAGAAAAACAATTTAACGAGTTACAATCTGTTCCAACAACCTCAAATATCACACCGAG
TTGTATTTCTTATACATGGTTTTCATTTCAACTGGAAATAATGGAAATTTTCGATGCAATGGCCAAAGCTTTGATAG
CAAAAGATAATTTTCTTGTAAATGTCGGTCGATTGGAGAAGGGCTGCTTGCGATGCTTCGGTTTTTAATGTTGCAG
GTTATTTCCAAAGCCGTTGCAAACACACGCCGTGTTGGAAAATATGTAGCTGATTTTACCAAATACTTGTAGACA
AATATAAAGTGCCGATGTCAAATATACGACTGATCGGGCATAGTTTGGGTGCACATACTTCAGTTTTTGCAGGAA
AACAAGTTCAAAAGTTAAATTAGGAAAATATAGTGAAATTATTGGGCTTGATCCTGCCGGGCCATCTTTTAGAT
CGACCAATTGTCCAGACAGACTGTGCGAAACAGACGCACAATATGTTCAAGTATTACATACTTCGAGTAAATTAG
GAACATACGATCAGATTGGTAGCGTTGATTTTTACGTAAATTATGGAGGAAGTCAACCTGGTTGCTTAGTTTCGAA
CCTGCTCTCATACAAAAGCCGTGCTATACATGACTGAATGTATAAACGTGAATGTTGTTTAATTGGAACACCAT
GGAGTAGTACTGGGAGTTCTCCGAAACCGAAACCAATCTCTGCGTGCAAAAGAGACATCTGCGTTTGC GTTGGAT
TGAACGCAAAAAGTTATCCTGCTAAAGGCTCGTTTTATGTACCGGTTGAAAAAATTCTCCTTATTGTCATAACG
AGGGCATTAACTTTAATTATAAACAAAAATTGTTATACATGAAAATGTATGTATGTAACGAATAAATAAATGAA
TAAATGAATAAAAAAAAAA 3`

```

A seqüência correspondente ao iniciador reverso (PLA1R), não foi evidenciada porque a amplificação da seqüência completa do cDNA de PLA1 foi conseguida com o par PLA1F/AMP, sendo AMP, o iniciador reverso que se anela à região adaptadora adicionada ao terminal 3' de todas as primeiras fitas de cDNA sintetizadas por RACE 3' neste trabalho. A amplificação fazendo-se uso do par de iniciadores (PLAF/PLAR) citado por Santos, 2007 não ocorreu, embora várias tentativas de otimização tenham sido feitas.

A seqüência obtida foi submetida à comparação em banco de dados utilizando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar sua similaridade em relação às seqüências já depositadas no banco de dados NCBI. Os resultados demonstraram uma maior similaridade com a PLA1 de *P. paulista*

(Santos, 2007) (95%) de acordo como esperado, seguido por *Polistes dominulus* (84%) e por *Polistes annularis* (82%) conforme demonstrado na **Figura 7** abaixo:

Accession	Description	Max score	Total score	Max ident
AY566645.1	<i>Polistes dominulus</i> venom phospholipase A1 1 precursor mRNA, comple	837	837	83%
AY566646.1	<i>Polistes dominulus</i> venom phospholipase A1 2 precursor mRNA, partial	826	826	84%
AY566649.1	<i>Polistes dominulus</i> venom phospholipase A1 4 precursor mRNA, partial	821	821	84%
AY566647.1	<i>Polistes dominulus</i> venom phospholipase A1 3 precursor mRNA, partial	821	821	84%
AF174527.1	<i>Polistes annularis</i> phospholipase A1 mRNA, complete cds	809	809	82%
AM491805.1	<i>Polybia paulista</i> pla1 gene for phospholipase A1 precursor	76.8	76.8	95%
EF101736.1	<i>Polybia paulista</i> venom gland phospholipase A1 mRNA, complete cds	76.8	76.8	95%

Figura 7. Resultado da análise de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) evidenciando os registros em banco de dados para as sequências de maior grau de similaridade com a sequência de PLA1 estudada.

As sequências de maior similaridade foram alinhadas utilizando o servidor Uniprot (www.uniprot.org/align_alignment) e os resultados podem ser vistos na **Figura 8**.

1	-----	0	<i>P.annularis</i>
1	AATATTTTCAAACCCGGATGATTTTATTTCCACAGTAAAGAAAAATCAGAAAGGATGAAT	60	<i>P.dominulus</i>
1	-----	0	<i>P.paulista</i>
1	-----	0	Santos_2007_P_paulista
1	-----	15	<i>P.annularis</i>
61	TTCAATATTCGATTTTATTCATATGTTTGTGAAAGTGTTAGATAATTGTTACGCGGCT	120	<i>P.dominulus</i>
1	-----	0	<i>P.paulista</i>
1	-----	12	Santos_2007_P_paulista
16	GATGATTTCGACGACATTTAGAAATGGTACCTTGAATAGAGGCATGTCTCCGGATTGTACT	75	<i>P.annularis</i>
121	GATGATTTCGACGACATTTAGAAATGGTACCTTGAATAGAGGCATGTCTCCGGATTGTACT	180	<i>P.dominulus</i>
1	-----	21	<i>P.paulista</i>
13	TATAGCATTTCTGTTTATTTGCTTTGGCACCCCTGGATCGCGGCTGATTCGGGAATGCCCG	72	Santos_2007_P_paulista
76	TTTAATGAGAAAGATATAGTATTTCTATGTTTACTCAAGGGATAAGCGAGATGGTATTATT	135	<i>P.annularis</i>
181	TTTAATGAGAAAGATATAGTATTTCTATGTTTACTCAAGGGATAAGCGAGATGGTATTATT	240	<i>P.dominulus</i>
22	TTTAACGAATATGATATTTTATTTTCGTTTACACAAGGGATAAGCAAGATGGTATTATT	81	<i>P.paulista</i>
73	TTTAACGAATATGATATTTCTGTTTGTGTATACCCGCCAGCAGCGCATGGCATTGTG	132	Santos_2007_P_paulista
136	CTTAAGAAAGAACTTTAAACGAATTACGATCTGTTTACAAAGCTACAATATCAAAACAA	195	<i>P.annularis</i>
241	CTTAAGAAAGAACTTTAAACGAATTACGATCTGTTTACAAAGCTACAATATCAAAACAA	300	<i>P.dominulus</i>
82	CTTAAGAAAGAACTTTAAACGAATTACGATCTGTTTACAAAGCTACAATATCAAAACAA	141	<i>P.paulista</i>
133	CTGACCGAAGAAACCCCTGCAGAACTATGATCTGTTTAAAAAAGCACCATTAGCCGCCAG	192	Santos_2007_P_paulista
196	GTGTATTTCTTATACATGGTTTCCTTTCAACTGGGAATAATGAAAACCTTCGTTGCTATG	255	<i>P.annularis</i>
301	ATTGCAATCTTATACATGGTTTCCTTTCAACTGGGAATAATGAAAACCTTCGTTGCTATG	360	<i>P.dominulus</i>
142	GTGTATTTCTTATACATGGTTTCCTTTCAACTGGGAATAATGAAAACCTTCGTTGCTATG	201	<i>P.paulista</i>
193	GTGGTGTATTATGATCATGGCTTTCTGAGCAACGGCAACGAAAACCTTTATTGCGATG	252	Santos_2007_P_paulista
256	TCGAAAGCTTTAATAGAAAAGATGATTTTCTTGTAAATTCGGTCGACTGGAAGAAGGGT	315	<i>P.annularis</i>
361	GCGAAAGCTTTGATAGAAAAGATGATTTTCTTGTAAATTCGGTCGACTGGAAGAAGGGT	420	<i>P.dominulus</i>
202	GCCAAAGCTTTGATAGAAAAGATGATTTTCTTGTAAATTCGGTCGACTGGAAGAAGGGT	261	<i>P.paulista</i>
253	GCGAAAGCTTTGATAGAAAAGATGATTTTCTTGTAAATTCGGTCGACTGGAAGAAGGGT	312	Santos_2007_P_paulista
316	GCTTGTAAATGCTTTTTCCTTCAACAAAGGATGCTTTGGGTTATTCCAAAGCCGTTGGAAAC	375	<i>P.annularis</i>
421	GCTTGTAAATGCTTTTTCCTTCAACAAAGGATGCTTTGGGTTATTCCAAAGCCGTTGGAAAC	480	<i>P.dominulus</i>
262	GCTTGTAAATGCTTTTTCCTTCAACAAAGGATGCTTTGGGTTATTCCAAAGCCGTTGGAAAC	315	<i>P.paulista</i>
313	GCGTGCACACGCGTTTGGAGCACCCCTGGATTATCTGGGCTATAGCACCGGTTGGGCAAC	372	Santos_2007_P_paulista

376	ACACGTCACGTTGGAAAAATTTGTAGCTGATTTTACAAAACACTACTGTAGAAAAATATAAA	435	P.annularis
481	ACACGTCACGTTGGAAAAATATGTAGCTGATTTTACAAAATATTAGTAGAACATATAAA	540	P.dominulus
316	ACACGCCGTGTTGGAAAAATATGTAGCTGATTTTACAAAATACTGTAGACAAATATAAA	375	P.paulista
373	ACCCGCCATGTGGGCAAAATATGTGGCGGATTTTACCAAACCTGCTGGTGAACAGTATAAA	432	Santos_2007_P_paulista
*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
436	GTGCTGATATCAATATACGATTGATCGGGCATAGTTTGGGCGGCATACCTCAGGTTTT	495	P.annularis
541	GTGCCGATGTCGAATATACGATTGATCGGCCATAGTTTGGGTGCGCATACCTCAGGTTTT	600	P.dominulus
376	GTGCCGATGTCGAATATACGACTGATCGGGCATAGTTTGGGTGCACATACCTCAGGTTTT	435	P.paulista
433	GTGAGCATGAGCAACATTGCGCTGATTGGCCATAGCCTGGGCGCGCATACCAGCGGCTTT	492	Santos_2007_P_paulista
*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
496	GCGGGAAGAAAGTTCAAAAGTTAAATAGGAAAATACAAGGAATATCGGGCTTGAT	555	P.annularis
601	GCAGGAAGAAAGTTCAAAAGTTAAATAGGAAAATATAAGGAATATCGGGCTTGAT	660	P.dominulus
436	GCAGGAAGAAAGTTCAAAAGTTAAATAGGAAAATATAGTGAATATTGGGCTTGAT	495	P.paulista
493	GCGGCAAGAAAGTGCAGGAAGTGAAGTGAACAAATATAGCAACATTGATGGCCTGGAT	552	Santos_2007_P_paulista
** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
556	CCTGCTGGACCGTATTTTCATCGGAGTGACTGTCCGGACAGACTTTGCGTAACAGACGCA	615	P.annularis
661	CCTGCTGGACCGTCTTTCTAACGAATAAATGTCCAAACAGACTTTGCGAAACAGACGCA	720	P.dominulus
496	CCTGCGGGCCATCTTTAGATCGACCAATTGTCCAGACAGACTGTGCGAAACAGACGCA	555	P.paulista
553	CCGCGGGGCGCGAGCTTTGATAGCAACGATTGCCCGGAACGCTGTGCGAAACCGATGCG	612	Santos_2007_P_paulista
*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
616	GAATATGTTCAAGTTATACATACATCAATCATATTAGGAGTATATTATAATGTTGGTAGC	675	P.annularis
721	GAATATGTTCAAGCTATACATACATCAGCCATATTAGGAGTATATTATAACGTTGGTAGC	780	P.dominulus
556	CAATATGTTCAAGTATTACATACTTCGAGTAAATAGGAACATACGATCAGATTGGTAGC	615	P.paulista
613	GAATATGTCGAGATTATTATACACGCAACATTCGCGCGTGTATAGCAAAATTGGCACC	672	Santos_2007_P_paulista
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
676	GTTGATTTCTACGTGAATTATGGAAAAATCAACCTGGTTGC-----AATGAACCA	726	P.annularis
781	GTTGATTTTACGTGAATTATGGAAAAAGTCAACCTGGTTGC-----AGCGAACCA	831	P.dominulus
616	GTTGATTTTACGTAAATTATGGAGGAAGTCAACCTGGTTGC-----TTAGTTCTGA	666	P.paulista
673	GTGGATTTTATATGAACATATGGCAGCCATCAGCGGGCTGGCGCCGCTTTTATAGCCCG	732	Santos_2007_P_paulista
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
727	TCCTGCTCTCATACGAAAGCCGTGAAATATCTGACTGAGTGCATAAAACATGAATGTTGT	786	P.annularis
832	TCCTGTTCTCATACGAAAGCCGTGAAATACCTGACTGAGTGTATAAAACGTGAATGTTGT	891	P.dominulus
667	ACCTGCTCTCATACAAAGCCGTGCTATACATGACTGAATGTATAAAACGTGAATGTTGT	726	P.paulista
733	AGCTGCAGCCATACCAAGCCGTGAAATATCTGACCGAATGCATTAAACATGAATGCTGC	792	Santos_2007_P_paulista
*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
787	TAAATTGGAACACCATGGAAGAAAT-----ATTTGAGCACTCCAAAACCAATTTCCCAG	840	P.annularis
892	TAAATTGGAACACCATGGAAGACTT-----ATTTAGCACGCCAAAACCAATTTCTCAG	945	P.dominulus
727	TAAATTGGAACACCATGGAGTAGTACTGGGAGTTCTCCGAAACCGAAACCAATCTCTGCG	786	P.paulista
793	CTGATTGGCACCCTGGGAAAAAT-----ATTTAGCACCCCGAAACCGATTAGCCAG	846	Santos_2007_P_paulista
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
841	TGCAGAGGAGACACCTGTGTTTGGCGTTGGATTGAATGCAAAAAGTTATCCTGCTAGAGGC	900	P.annularis
946	TGCAAAAGAGACACCTGTGTTTGGCGTTGGACTGAACGCTCAAAGTTATCCTGCTAAAGGC	1005	P.dominulus
787	TGCAAAAGAGACATCTGCGTTTGGCGTTGGATTGAACGCAAAAAGTTATCCTGCTAAAGGC	846	P.paulista
847	TGCACCAAGATACCTGCGTGTGCGTGGGCTGAACGCGAAAAGCTATCCGGCGCGCGGC	906	Santos_2007_P_paulista
**** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
901	GCAITTTTATGCACCGGTTGAAGCAATGCACCTTATTGCCATAACGAGGGGATTAACTT	960	P.annularis
1006	TCAITTTTATGTACCTGTTGATAAAGATGCACCTTATTGCCATAACGAGGCATTAACTG	1065	P.dominulus
847	TCGTTTTATGTACCGGTTGAAAAAATCTCCTTATTGTCATAACGAGGGCATTAACTT	906	P.paulista
907	AGCTTTTATGTGCGGTTGGAAGCGACCGCGCGCTATTGCCATAACGAGGCATTAACTG	966	Santos_2007_P_paulista
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *			
961	TAATTATAAACAAAGTCAATGTACACAAAAATGTATCTATTGATGAATATTAAATGAAT	1020	P.annularis
1066	TAATTGTAAACAAATAGAAAATGTATA-AATAATAATGAATAAATGAACAGTCAAAAAA	1124	P.dominulus
907	TAATTATAAACAAAAATTTGTTATACATGAAAATGTATGTAT-----GTAACGAATAAAT	960	P.paulista
967	TAA-----	969	Santos_2007_P_paulista

1021	AAACGAACAGTCAAATAAAAAAAAAAAAA-----	1048	P.annularis
1125	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1171	P.dominulus
961	AAATGAATAAATGAATAAAAAAAAA-----	985	P.paulista
970	-----	969	Santos_2007_P_paulista

Figura 8. Alinhamento das sequências de cDNA da PLA1 de *P. paulista* determinada neste trabalho com as de *P. annularis*, *P. dominulus* e de *P. paulista* obtida por Santos, (2007). (Servidor Uniprot: www.uniprot.org/align_alignment). Em cinza estão evidenciadas regiões de similaridade de sequência entre estas espécies. Notar as regiões não concordantes entre as sequências de cDNA obtidas por Santos, 2007 e por este trabalho, indicativo da existência de polimorfismo entre eles.

[illegible]

Essas diferenças de nucleotídeos provavelmente ocorrem pelo fato de que foram observados por Santos (2007) sete distintas isoformas para a PLA1 de *P. paulista*. Nossos resultados indicam que a sequência aqui determinada pode referir-se a uma forma polimórfica diferente daquela sequenciada e depositada no GenBank pela autora. Vale também ressaltar que quando se trabalha com um grande “pool” de indivíduos como é o caso deste estudo, a ocorrência de polimorfismos na população é representativa, sendo este um aspecto muito interessante e importante a ser considerado nos estudos de alergia a venenos de insetos, já que estes dificilmente atacam as vítimas sozinhos, mas sim em grande número.

4.6 Análise da proteína PLA1 traduzida.

A tradução da sequência de nucleotídeos de cDNA da fosfolipase A1 foi obtida por meio do Programa Six Frame Translation (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seqtil/Options/sixframe.html>) no frame +1 e a proteína deduzida comparada com as fosfolipases A1 das vespas filogeneticamente mais próximas já citadas anteriormente. O alinhamento foi feito pelo programa Multalin (**Figura 10**), sendo que foram observados 87 aminoácidos diferentes entre a sequência obtida por Santos, (2007) e a sequência aqui determinada. Destes 87 aminoácidos diferentes, 35 resíduos estão fora do consenso com as demais sequências alinhadas demonstrando mais uma vez que a sequência aqui determinada trata-se de uma forma polimórfica do alérgeno PLA1. A proteína determinada apresentou 302 aminoácidos, ponto isoelétrico de 9.1 e massa molecular estimada em 33330.38 KDa, sendo rica em aminoácidos Alanina, Leucina, Isoleucina, Valina, Glicina e Serina. Esta análise foi realizada pelo programa EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/pepinfo/>).

>Polybia paulista_985 pb, frame+1, 302 aa

```
GLIPECPFNEYDILFFVYTRDKQDGIILKKNLTSYNLFQQPQISHRVVFLIHGFISTGNNG
NFDAMAKALIAKDNFLVMSVDWRRRAACDASVFNVAGYSKAVANTRRVGKYVADFTKILVDKY
KVPMSNIRLIGHSLGAHTSGFAGKQVQKLKLGKYSEIIGLDPAGPSFRSTNCPDRLCETDAQ
YVQVLHTSSKLGTYDQIGSVDFYVNYGGSQPGCLVRTCSHTKAVLYMTECIKRECCLIGTPW
SSTGSSPKPKPISACKRDICVCVGLNAKSYPAKGSFYVPVEKNSPYCHNEGIKL*
```

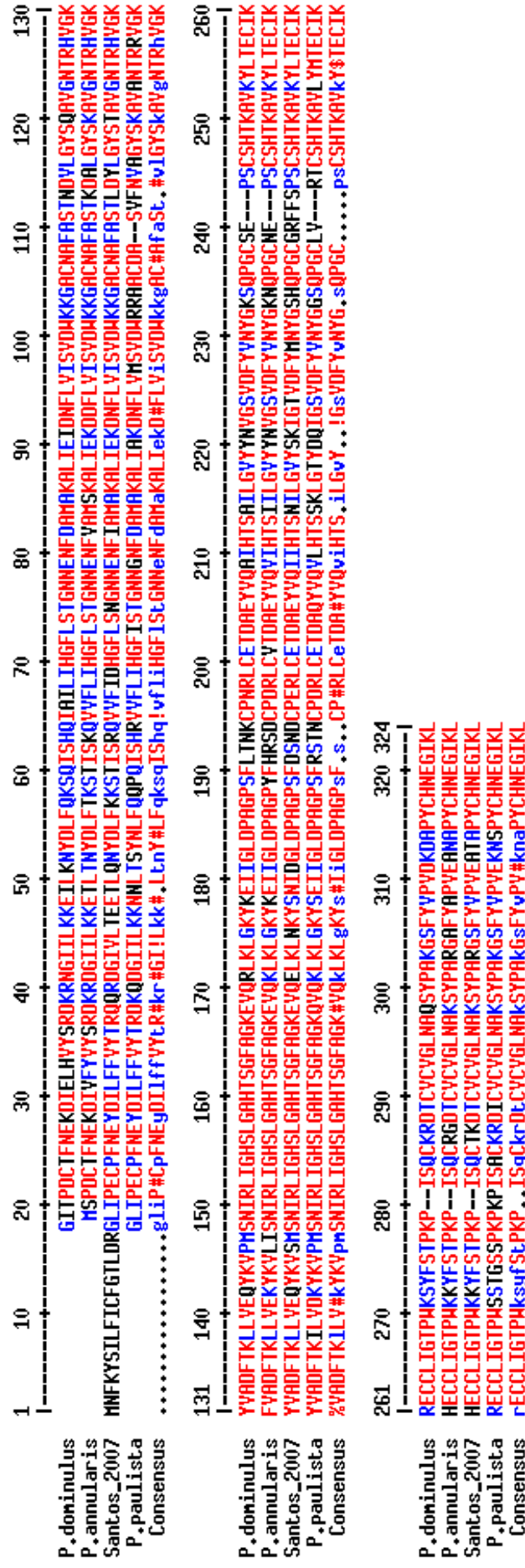


Figura 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos do alérgeno PLA1 dos venenos de *P. dominulus*, *P. annularis* e *P. paulista* depositada por Santos (2007), e da sequência de *P. paulista* determinada neste trabalho.

4.7 Análise dos domínios protéicos conservados

A análise da sequência de aminoácidos da PLA1, foi feita pelo programa BLASTprotein (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) revelando se tratar de uma proteína da super família das esterases lipases (**Figura 11**). As lipases são agrupadas como uma forma especial de esterases e são classificadas como serina hidrolases por apresentarem o aminoácido serina em seu sítio ativo e por atuarem em substratos insolúveis em água hidrolisando acilglicerois preferencialmente os de cadeia longa. Seus substratos naturais atuam sobre uma grande gama de outros substratos naturais e sintéticos (Wilson et al., 2006). Por sua vez, as esterases também são hidrolases amplamente distribuídas na natureza, mas sua atividade enzimática é restrita à hidrólise de ligações ésteres em substratos solúveis em água (FERNANDES et al., 2004).

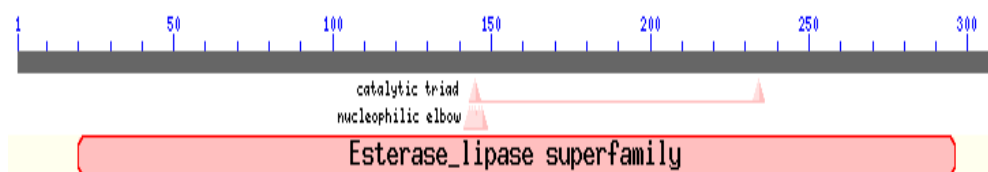


Figura 11. Resultado da análise de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostrando em vermelho que a proteína fosfolipase A1 de *P. paulista* é integrante da superfamília das esterases/lipases.

Os domínios conservados foram analisados pelo Programa CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) e desta forma foram encontrados cinco motivos estruturais conservados, sendo que três deles estão na mesma superfamília e dois são independentes (**Figura 12**).

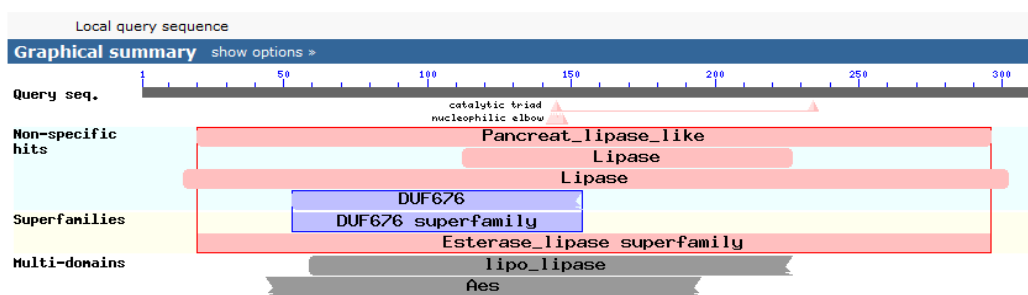


Figura 12. Motivos conservados encontrados na sequência de PLA1 de *P. paulista*. Dentro da marcação em vermelho estão os motivos conservados da mesma superfamília e em cinza os outros dois motivos independentes.

4.8 Caracterização da proteína deduzida e depósito da sequência de cDNA de PLA1 no GenBank.

Para análise do sítio ativo, a sequência protéica determinada foi submetida a análise pelo software ExPASy-Prosite e o resultado obtido apresentado na **Figura 13**. Por esta análise, a localização do sítio ativo da PLA1 deve ser encontrado entre os resíduos 131 a 140, sendo composto por 10 aminoácidos, com a sequência 5' IRLIGHSLGA 3'. A presença do resíduo de serina no sítio ativo, característica das serino-hidrolases está marcado nesta sequência em amarelo.

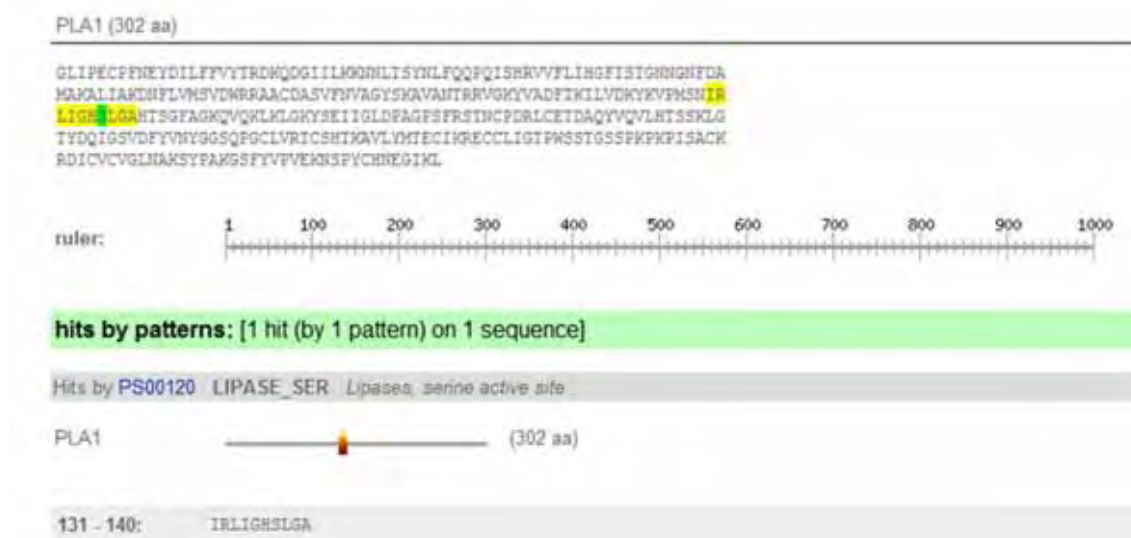


Figura 13. Análise teórica da posição do sítio ativo da enzima alergênica PLA1 de *P. paulista* utilizando o software ExPASy-Prosite (<http://ca.expasy.org/prosite/>), mostrando que o mesmo deve estar localizado entre os resíduos 131 e 140.

As análises revelaram uma proteína lipase com sítio ativo contendo o aminoácido serina, daí a sua classificação como uma serino-hidrolase. Dados da literatura revelam que a região mais conservada em todas estas proteínas é centrada em torno deste resíduo de serina, que juntamente com uma histidina e um resíduo de ácido aspártico fazem parte de um sistema de retransmissão de carga que catalizam a transferência de ácidos graxos entre fosfatidilcolina e colesterol. Esta região também está presente em lipases de origem procariótica e na *Lecitina Colesterol Aciltransferase*, enzima que participa do transporte reverso do colesterol (MCLEAN et al., 1990). Além disso, as lipases são enzimas lipolíticas que hidrolisam a ligação éster dos triacilgliceróis.

Após estas análises foi feito o depósito da sequência completa de nucleotídeos da PLA1 de *P. paulista*, no GenBank pelo Programa Sequin, disponível

em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin>. Foi gerado o código de acesso “HQ023233.1” para publicações e textos científicos em geral.

4.9 Construção do modelo estrutural da proteína PLA1 deduzida pela sequência de cDNA, utilizando-se a técnica de homologia

A construção do modelo teórico da proteína PLA1 do veneno da vespa *P. paulista* foi possível após a tradução da sequência de bases de seu cDNA completo. Os passos iniciais para a construção do modelo estrutural foram feitos a partir da busca por um molde (uma estrutura protéica já determinada por cristalografia de Raios X) de maior similaridade possível com a PLA1 em um Banco de Dados de estruturas protéicas (PDB). Por meio desta busca foi encontrada a estrutura tridimensional de uma lipase pancreática de cobaias, com função de fosfolipase A1 (PDB 1GPL) e que foi resolvida por cristalografia de Raios X com uma resolução de 2.01 Å (WITHERS-MARTINEZ et al., 1996). Quando alinhadas, as duas sequências apresentaram 30% de similaridade, quantidade relativamente baixa, porém satisfatória para modelagem por homologia (**Figura 14**).

1	AEVCYSHLGCFSDEKFPWAGTSQRPIKSLPSDPKKINTRFLLYTNENQNSYQLITATDIAT	60	1GPL
1	-----GLIPECFPN-----EYDILFFVYTRDKQDGIILKKNLTSY	36	Fosfolipase
	: * * :		
61	IKASNFNLNRKTRFIIHGFTDSGENSWLSDMCKNMFQVEKVNCCICVDWKGGSK-----	113	1GPL
37	NLFQQPQISHRVVFLIHGFISTGNNGNFDAMAKALIAKDNFLVMSVDWRRACDASVFNV	96	Fosfolipase
	. : : : : . * : * * * . : * : . : . * . * : : . : . * * * : . :		
114	AQYSQASQNIIRVVGAEVAYLVQVLSTSLNYPENVHIIGHSLGAHTAGEAGKRLN----	169	1GPL
97	AGYSKAVANTRRVGKYVADFTKILVDKYKVPMSNIRLIGHSLGAHTSGFAGKQVQKLG	156	Fosfolipase
	* * * : * * * * * * * : : : * . : . . * : : * * * * * * * * * * * * * * * *		
170	LVGRITGLDPAEPYFQDTPEEVRLDPDAKFVDVIHTDISPILPSLFGMSQKVGHMDFE	229	1GPL
157	KYSEIIGLDPAGPSFRSTNCPDRLCETDAQYVQVLHTSS-----KLGTYDQIGSVDFY	209	Fosfolipase
	. . * * * * * * * : * : * * : * : * : * : * . : * : : * : * :		
230	PNGGKMPGCKTGISCNHHRSIEYHSSILNPEGFLGYPCASYDEFQESGCFPCPAKGCP	289	1GPL
210	VNYGGSQPGCLVRT-CSHTKAVLYMTECIKRECLIGTPWSSSTGSSPK----PKPISACK	264	Fosfolipase
	* * . * * * . * * : : * * . * . : : * * : * * . : * * . * *		
290	KMGHFADQYPGKTNAVEQTFFLNTGASDNFTRWRYKVSVTLSGKKVTGHILVSLFGNKGN	349	1GPL
265	RDICVCVGLNAKSYPAKGSFYVPVEKNS---PYCHNEGKI-----	302	Fosfolipase
	: . . . * : . : : * : : . . : : : . : *		
350	SKQYEIFKGTLPKPDSTHSNEFSDVDVGDLMVKFIWYNNVINPTLPRVGASKIIVETNV	409	1GPL
303	-----	302	Fosfolipase

410	GKQFNFCSPETVREEVLLTLTPC	432	1GPL
303	-----	302	Fosfolipase

Figura 14. Alinhamento entre as sequências primárias de lipase pancreática de cobaias (1GPL) e PLA1 de *P. paulista*. As regiões de identidade mais importantes foram assinaladas em cinza escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados. O alinhamento foi feito utilizando o servidor Uniprot (www.uniprot.org/align_alignment).

Em alguns casos, cerca de 27% de similaridade entre as sequências é suficiente para um bom alinhamento e, conseqüentemente, para a construção de um bom modelo. Há casos, porém, em que apesar do alto grau de similaridade e do bom alinhamento não se obtém modelos satisfatórios. Cada modelagem é um problema particular e deve-se ter sempre em mente que a construção de um modelo protéico é uma tarefa que deve ser fundamentada em princípios de evolução molecular para cada grupo específico de proteínas homólogas (SANTOS-FILHO, 2003).

É importante ressaltar também a inexistência de uma estrutura protéica mais proximamente relacionada às fosfolipases de veneno de vespas, e este fato se dá devido às dificuldades encontradas principalmente na obtenção de quantidades de material purificado necessário para a cristalização e resolução por ressonância magnética nuclear. Para exemplificação do problema, o principal banco de dados de sequências primárias, o SWISS-PROT, em 2001 possuía 101.602 sequências protéicas e, no mesmo período, somente 14.301 estruturas estavam disponíveis no PDB (SANTOS-FILHO et al., 2003).

Alguns modelos foram construídos para a PLA1 do veneno da vespa *P. paulista* pelo programa MODELLER (SALI et al., 1993) e o de melhor energia foi submetido à análise estereoquímica com emprego do programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1994). Por meio do programa PyMOL (DELANO, 2004) foi possível visualizar o modelo tridimensional construído para a proteína PLA1, o qual apresentou um dobramento do tipo sanduíche beta, constituído por oito fitas betas antiparalelas ligadas a sete alfas hélices e por várias alças externas (loops) (**Figura 15**).

Segundo Ollis, 1992, esta estrutura é comum às várias enzimas hidrolíticas de diferentes origens filogenéticas e funções catalíticas, que devem provavelmente ter divergido de um ancestral comum, de modo a preservar o arranjo dos resíduos catalíticos, mas não o sítio de ligação.

O arranjo original dos resíduos de aminoácidos da PLA1 produz uma tríade catalítica (**Figura 16**), formada pelos resíduos His226, Asp165 e Ser137. Essa tríade catalítica é encontrada no interior do sítio ativo da molécula e é responsável por quebrar as ligações peptídicas dos polipeptídios (LEHNINGER, 2007), no caso, os fosfolípidios de membrana, pela ação da fosfolipase do veneno de vespa.



Figura 15. Modelo tridimensional, gerado pelo programa MODELLER (SALI et al., 1993) e visualizado pelo programa PyMol (DELANO, 2004) para a proteína PLA1 do veneno da vespa *P. paulista*. A proteína foi deduzida por tradução da sequência de bases de seu cDNA completo, o qual foi clonado, seqüenciado e analisado em Banco de Dados. Observa-se que a PLA1 de *P. paulista* apresenta uma formação do tipo sanduíche beta, constituída por oito fitas betas antiparalelas ligadas a sete alfas hélices e por “loops”.

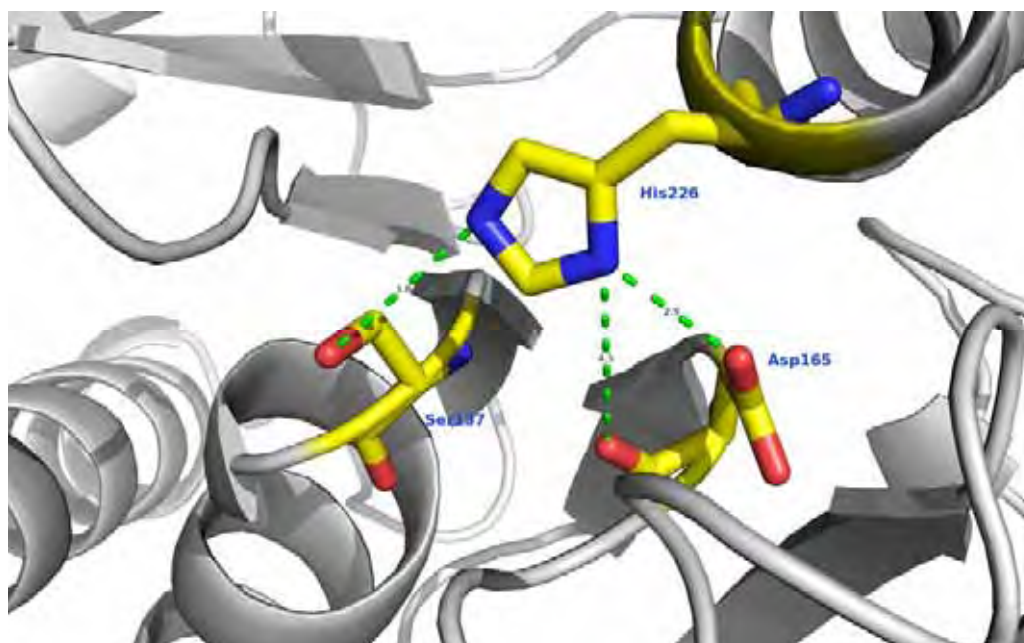


Figura 16. Triade catalítica formada pelos resíduos His226, Asp165, e Ser137, responsáveis pela ligação ao substrato.

Atualmente, tem sido identificados quatro grupos de enzimas que contêm tríades catalíticas relacionadas por evolução convergente: as serino-proteases eucarióticas, as cisteíno-proteases, as subtilisinas e as alfa/beta hidrolases (OLLIS, et al.,1992), sendo que as fosfolipases se encontram neste último grupo.

Com a modelagem estrutural da PLA1 do veneno da vespa social foi possível também observar a presença de duas pontes dissulfeto. Essa interação entre os resíduos de cisteína é responsável pela estabilidade e dobramento da estrutura protéica. Na PLA1, as pontes S-S encontram-se entre os resíduos de cisteínas: Cys263-Cys268 e entre Cys219-Cys224 (**Figura 17**).

Outra análise relevante sobre a estrutura tridimensional da PLA1 de *P. paulista* é à predição das regiões potencialmente imunogênicas (epítomos) que foi realizada pelo programa “Conformational Epitope Prediction Server” (KULKARNI-KALE, BHOSLE, KOLASKA, 2005) sendo as regiões encontradas, analisadas na estrutura do modelo pelo programa MODELLER (SALI et al., 1993) e visualizados com o auxílio do programa PyMOL (DELANO, 2004). Desde modo, foi possível observar que a molécula possui dezesseis principais sítios potenciais de epítomos, sendo doze conformacionais, localizados nas alfa-hélices, e quatro deles lineares localizados nas regiões de “loops” internos e externos (**Figura 18**).

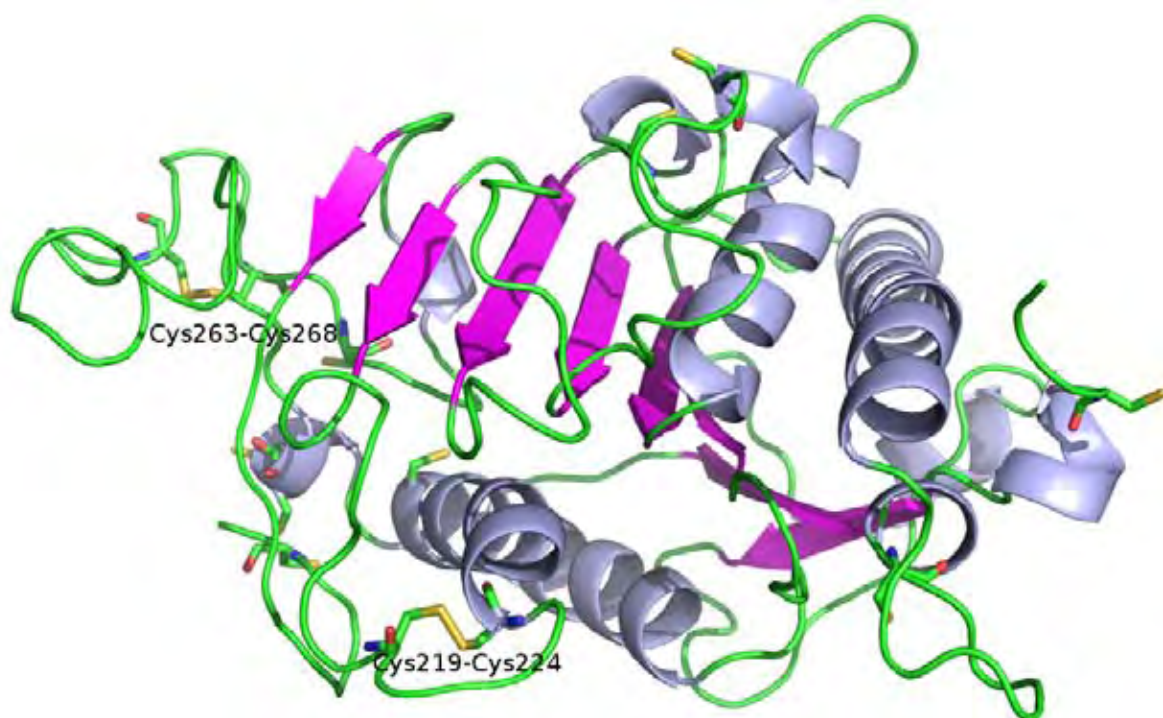


Figura 17. Modelo protéico tridimensional da PLA1 do veneno de *P. paulista* mostrando as duas pontes dissulfeto formadas entre os resíduos Cys263-Cys268 e entre Cys219-Cys224.

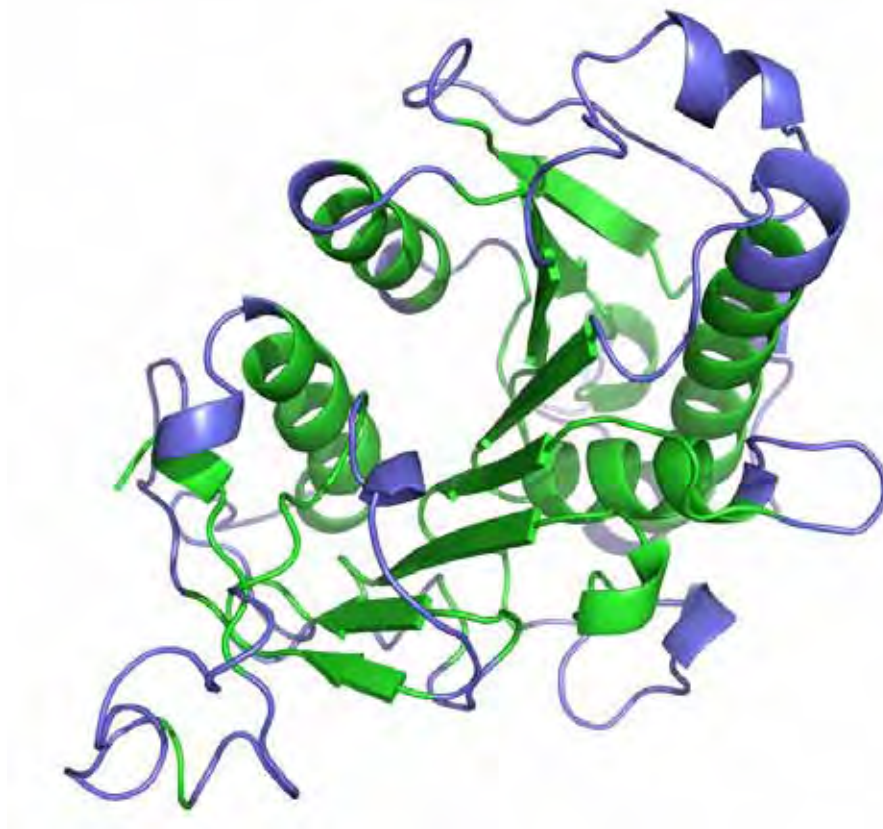


Figura 18. Modelo tridimensional da proteína PLA1 do veneno de *P. paulista* evidenciando em roxo as dezesseis regiões potencialmente imunogênicas (epítomos) presentes na molécula tanto na forma conformacional (Doze regiões) quanto lineares (Quatro).

As sequências de resíduos de aminoácidos presentes nestas 16 regiões potencialmente imunogênicas também foram identificadas pelo servidor “Immune Epitope Database and Analysis Resource” (LARSEN, et al., 2006) as quais podem ser visualizadas na **Tabela 4**.

Tabela 4: Regiões previstas como epitopos na proteína alergênica PLA1 do veneno de vespa *P. paulista* de acordo com análise realizada pelo servidor *Immune Epitope Database and Analysis Resource*. Os aminoácidos que estão em letra minúscula, apresentam acessibilidade pelo anticorpo menor que 25%.

No.	Posição de início	Posição final	Peptídeo	Tamanho do peptídeo
Epítopos Conformacionais				
1	20	47	RD KQDGIIlKKnNLTSYnLFqQpQISHR	28
2	73	76	AKDN	4
3	90	101	DASVF NVaGYSK	12
4	121	130	VD KyKvPmSN	10
5	169	178	PSf RSTNCPD	10
6	195	197	SKL	3
7	200	202	YDQ	3
8	212	223	YgGS qPGcLVRT	12
9	247	252	PWS StG	6
10	255	267	PKPK pISACKRDI	13
11	274	281	NaKS YPAK	8
12	287	293	PvE KNSP	7
Epítopos Lineares				
13	3	12	IPE CPFNEyD	10
14	60	63	NNGN	4
15	149	154	QvQ KLK	6
16	238	241	KREC	4

A determinação das estruturas tridimensionais de proteínas nem sempre tem sido possível devido às limitações relacionadas às técnicas de cristalografia de Raios X e Ressonância magnética nuclear (RMN), tornando a utilização da modelagem molecular comparativa muito útil, pois estas estruturas tridimensionais também predizem a localização do sítio ativo e a função de algumas proteínas.

Diante disto, pode-se dizer que as estruturas tridimensionais de proteínas obtidas por modelagem comparativa, fornecem dados bastante importantes e informativos quando obedecidos os padrões essenciais para obtenção de um modelo confiável. Assim, as informações aqui obtidas por meio do modelo teórico da proteína alergênica PLA1 de *P. paulista* representam uma grande contribuição ao entendimento estrutural, bioquímico e imunogênico dessa proteína.

4.10 Preparação de anticorpos policlonais contra a PLA1 natural

4.10.1 Eletroforese preparativa de extratos de veneno bruto de *P. paulista* em géis desnaturantes de poliacrilamida e isolamento da fração eletroforética de PLA1 para imunização em camundongos BALB/c

O extrato bruto de 1000 glândulas dissecadas de indivíduos de *P. paulista* foi submetido à eletroforese preparativa desnaturante de gradiente (10-18%) de poliacrilamida (**Figura 19**), sendo toda a amostra aplicada no gel ao lado de um padrão de proteínas de massa molecular conhecidas.

A finalidade deste experimento foi de obtermos um perfil eletroforético adequado para a separação das bandas protéicas do veneno, para posterior recorte das bandas correspondentes às diferentes frações de interesse (no caso as das fosfolipases de 12 a 19 kDa). O perfil eletroforético do extrato bruto do veneno de *P. paulista* mostra exatamente isto, ou seja, que a fosfolipase natural, observada nesta faixa de massa molecular, é o alergeno mais abundante, visto que pode ser observado como uma das bandas de maior intensidade no gel, o que está de acordo a maioria dos venenos de Hymenoptera. A fração eletroforética correspondente à PLA1 foi então utilizada para a imunização de camundongos BALB/c, conforme materiais e métodos, item **3.2.17**.

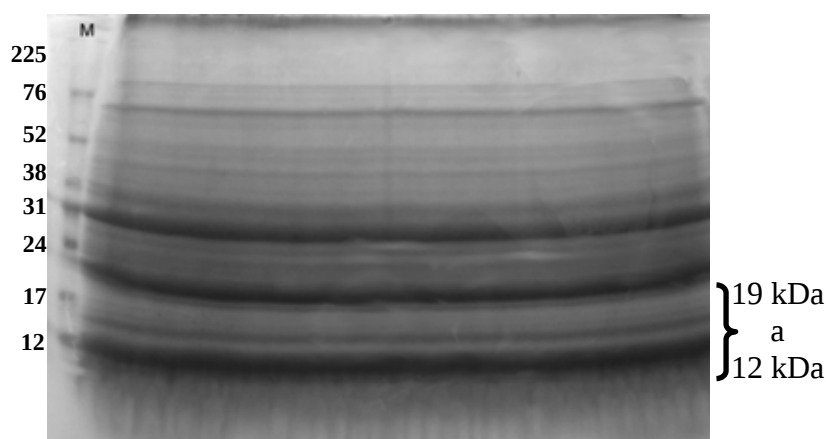


Figura 19. Perfil protéico em SDS-PAGE preparativo de gradiente (10-18%) de poliacrilamida, do extrato bruto do veneno de *P. paulista*. A amostra aplicada continha cerca de 10 mg de proteínas totais. As bandas foram coradas com Coomassie Blue G-250 e a seguir a faixa de massa molecular de 12-19 KDa, indicada na imagem pela chave à direita, foi recortada do gel para imunização de camundongos BALB/c fêmeas. À esquerda tem-se um padrão protéico pré corado de alta massa (225, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa) utilizado para o cálculo de massa molecular de cada banda.

4.10.2 Análise da especificidade e reatividade imunológica cruzada dos anticorpos policlonais produzidos contra a fração eletroforética correspondente a PLA1 do veneno bruto de *P. paulista*

O soro de camundongos sensibilizados com a fração eletroforética protéica de 12-19 kDa, relativa ao intervalo de massa molecular do alérgeno fosfolipase, foi testado quanto ao nível de especificidade em relação ao próprio extrato de veneno bruto de *P. paulista* e quanto à imunoreatividade cruzada, com o veneno bruto de outros insetos, como das vespas: *P. sericea*, *P. ignobilis*, *Agelaia pallipes pallipes*, *Polistes lanio lanio*; da abelha: *Apis mellifera* e da espécie de formiga: *Solenopsis invicta*, previamente submetidos à eletroforese desnaturante de poliacrilamida (15%).

A **Figura 20** apresenta o resultado do experimento de imunodeteção realizado com o sistema cromogênico de Fosfatase Alcalina ligada ao anticorpo secundário-anti-IgG de camundongo. A importância da reatividade cruzada em pacientes alérgicos ao veneno de vespas sociais é inquestionável, pois estas interações têm impacto direto sobre o diagnóstico e a seleção da melhor conduta terapêutica.

Os resultados desta análise comprovaram a especificidade do anticorpo produzido para a PLA1 de *P. paulista*, pois foi verificado reconhecimento antígeno-

anticorpo com as diferentes isoformas de PLA1 que já haviam sido descritas por Santos (2007) (proteínas de massa molecular entre 12 e 19 kDa). Uma marcação em torno de 28 a 30 kDa também foi observada, sendo a princípio tratada como uma reação inespecífica. Porém com a determinação da massa molecular da sequência de PLA1 desse estudo, em torno de 33 kDa (programa EMBL-EBI: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/pepinfo/>), este dado possibilitou levantar a hipótese da existência de outras isoformas distintas daquelas descritas anteriormente por Santos, 2007. Adicionalmente, os resultados da imunodeteção também demonstraram a existência de diferentes níveis de reatividade cruzada com o mesmo alérgeno fosfolipase do veneno dos outros insetos testados, bem como, de suas possíveis isoformas, sendo que o maior nível de reatividade cruzada foi observado pela maior intensidade da banda entre 15-16 kDa no veneno de *Polybia lanio lanio*.

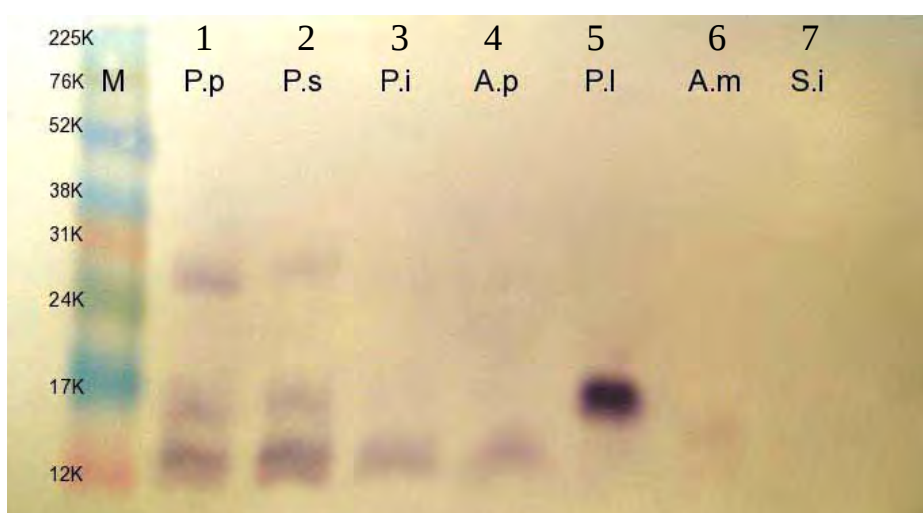


Figura 20. Western Blotting utilizando o anticorpo policlonal produzido em camundongos BALB/c contra a fração eletroforética de PLA1 do veneno de *P. paulista*, para análise de sua especificidade à fosfolipase do mesmo veneno (1) e o nível de imunoreatividade cruzada entre os extratos brutos dos venenos de 2- *Polybia sericea*, 3- *Polybia ignobilis*, 4- *Agelaia pallipes pallipes*, 5- *Polistes lanio lanio*, 6- *Apis mellifera* e 7- *Solenopsis invicta*. No gel de sistema desnaturante de poliacrilamida (15%), foram aplicadas 80 µg de proteínas totais de cada um destes extratos.

Os resultados obtidos na análise de *Western Blotting* foram quantificados por densitometria através do Software Scion Image®. O nível de especificidade dos anticorpos policlonais pela fração de PLA1 do veneno de *P. paulista* pode ser quantificado em 449 u.a- unidades arbitrárias. Enquanto que, os níveis de imunoreatividade cruzada com os demais venenos testados foram quantificados em: *P. sericea* (386 u.a), *P. ignobilis* (314 u.a), *A. pallipes pallipes* (287 u.a) e *P. lanio*

lanio (625 u.a) (**Figura 21**). O mesmo não foi observado nos venenos de *Solenopsis invicta* e *Apis mellifera*. Os valores densitométricos de maior intensidade foram encontrados para as isoformas de massa molecular entre 12 e 13 kDa com exceção da vespa *P. lanio lanio*, que dentre todas apresentou maior intensidade na região entre 15 e 16 KDa, conforme já mencionado.

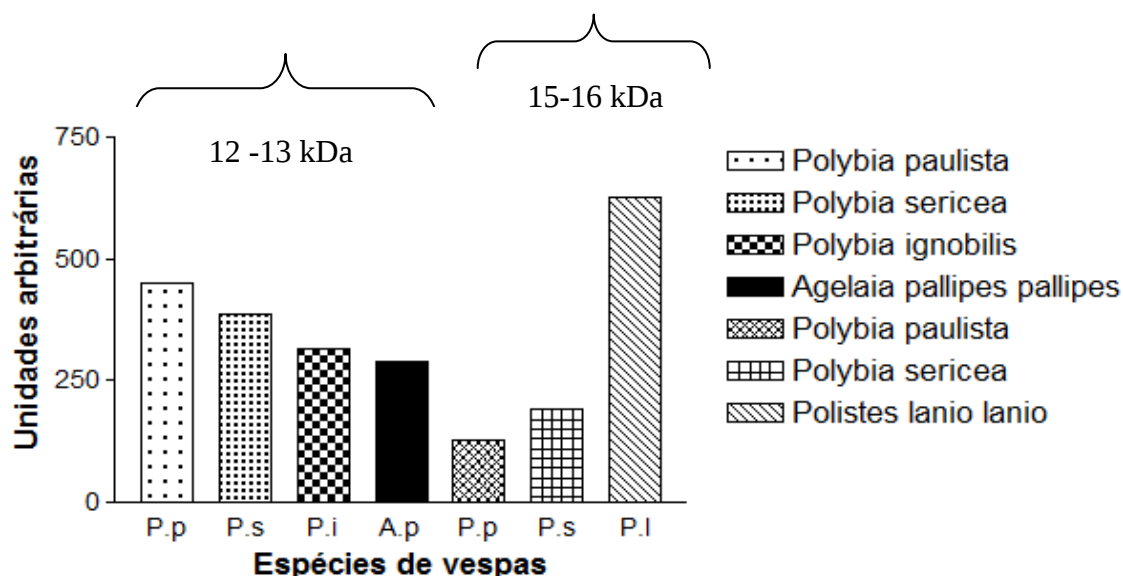


Figura 21. Histograma relativo à análise densitométrica do perfil de *Western Blotting* da Figura 20, em que a intensidade das bandas foi quantificada em unidades arbitrárias para melhor comparação dos resultados. Observar a maior intensidade da reação cruzada da PLA1 de *P. paulista* com a fosfolipase (15-16 kDa) no veneno da vespa *Polistes lanio lanio*.

Um fato importante que deve ser mencionado e destacado é sobre o nível de especificidade da técnica aqui utilizada para separação da fração protéica de PLA1 do veneno. Embora a separação das proteínas através de SDS-PAGE não seja uma técnica muito eficiente, podendo inclusive comprometer a qualidade dos resultados, levando à obtenção de alguns resultados inespecíficos, sua utilização no estágio inicial da pesquisa foi de extrema importância para a localização do alérgeno no “pool” de proteínas do veneno. E estes dados foram mais tarde comparados com a obtenção da PLA1 recombinante.

4.11 Amplificação e Clonagem da PLA1-Rec

Depois de testados vários protocolos de amplificação a partir do RNA extraído das glândulas de veneno da vespa e *P. paulista* sem muito sucesso, usamos como substrato das PCRs o DNA plasmidial dos clones recombinantes de PLA1, obtidos na clonagem em TOPO®-GW. A amplificação ocorreu de forma surpreendente

(**Figura 22A**) e obtivemos desta forma, uma quantidade de produto amplificado com os iniciadores de expressão (PLA1exp) para proceder a clonagem do gene todo, já contendo os sítios das enzimas de restrição *EcoR1* e *Nde1*.

A clonagem do fragmento PLA1-exp contendo os sítios de restrição no vetor TOPO®-GW e transformação nas células One Shot® teve sucesso logo no primeiro experimento, obtendo-se uma grande quantidade de clones recombinantes. Esta estratégia serviu para o armazenamento de vários clones recombinantes já contendo os sítios de corte das enzimas de restrição.

A confirmação do inserto foi feito por análise de restrição simples com a enzima *EcoR1* usando-se preparações plasmidiais dos clones supostamente recombinantes, selecionados aleatoriamente na placa. Os plasmídeos confirmados como recombinantes foram seqüenciados a fim de se fazer checagem da sequência completa de PLA1, acrescida dos sítios de restrição das enzimas *EcoR1* e *Nde1*. Após confirmação, as construções plasmidiais foram duplamente digeridas com as enzimas *EcoR1* e *Nde1* como pode ser observado na **Figura 22B**. Posteriormente, as reações foram misturadas, em um único tubo tipo *eppendorf*, corridas em maior volume em um gel de agarose a 1% e a banda de interesse recortada para purificação.

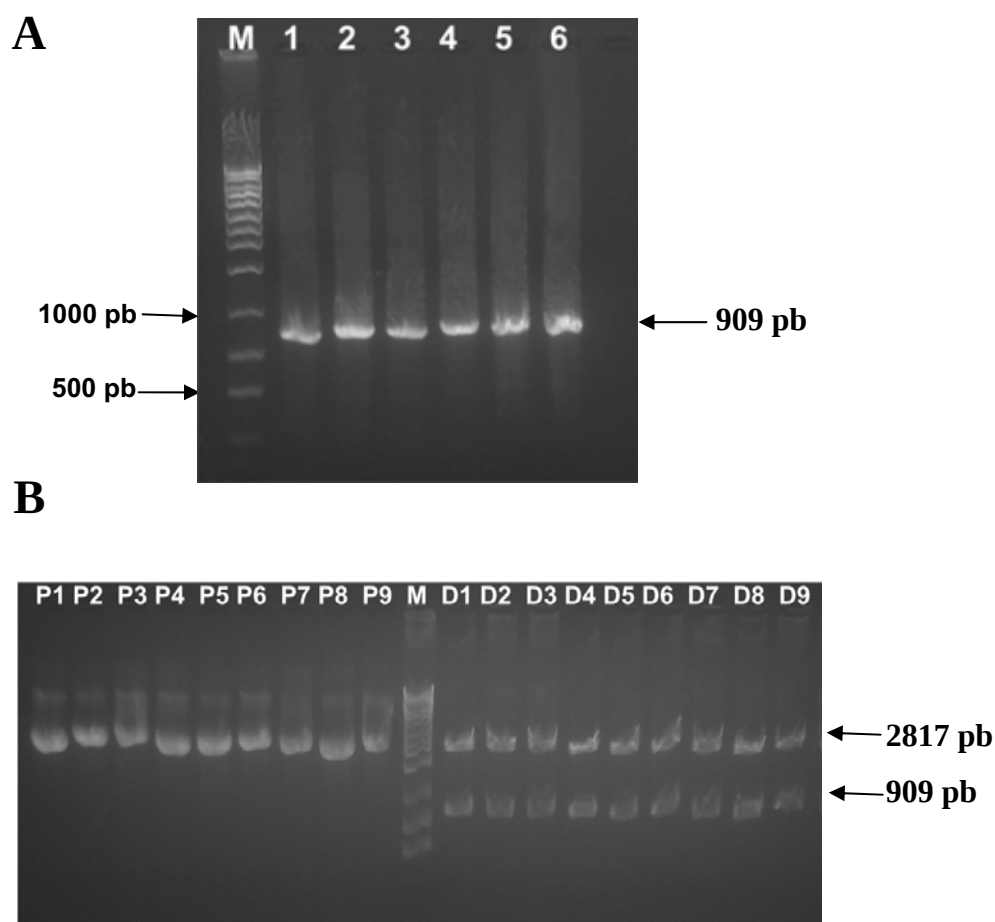


Figura 22. (A) Perfil eletroforético da banda correspondente ao cDNA de 909 pb amplificado a partir das preparações plasmidiais de TOPO/GW_ PLA1Rec, usando-se os iniciadores de expressão. À esquerda, **M** refere-se ao marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder (300 a 10.000 pb). **(B)** Resultado das análises de dupla-restrição dos DNAs plasmidiais recombinantes de PLA1_Rec2 (D1-D9) com enzimas *EcoR1* e *Nde1*. À esquerda, P1-P9, estão os plasmídeos não clivados. Pode-se constatar que as bandas correspondentes aos plasmídeos clivados apresentam tamanho de 2817 pb, enquanto que as bandas correspondentes ao inserto são de 909 pb. A análise foi realizada em gel de agarose 1,5% em TAE 1x e a amostra visualizada com Blue Green (1:5, Blue Green: amostra).

4.12 Amplificação e purificação do vetor de expressão pET-28a

O vetor de expressão “vazio” pET-28a, que previamente havia sido clonado e amplificado em células DH5 α quimiocompetentes, foi extraído através de minipreps e analisado em gel de agarose 1,5% (**Figura 23A**).

Assim como foi feito com as reações do inserto (cDNA de PLA1 com sítios de restrição *NdeI* e *EcoRI*), os tubos contendo pET-28a foram duplamente digeridos com estas enzimas. Entretanto, o vetor teve que ser também desfosforilado para que a reação seguinte de ligação vetor-inserto, pudesse ocorrer. As amostras de inserto e de vetor foram separadamente reunidas em tubos *ependorf* e submetidas à

eletroforese preparativa (em grande volume). Após a corrida, conforme esperado, pode-se verificar a ocorrência de digestão completa do plasmídeo, pela observação de uma única banda linear para o vetor pET-28a e, no caso das amostras contendo os insertos de PLA1, duas bandas foram observadas, sendo as superiores correspondentes ao plasmídeo TOPO/GW e as inferiores, correspondentes aos insertos de PLA1 digeridos. Em seguida, as bandas de interesse foram recortadas, aquecidas à 50°C e imediatamente usadas para a reação de ligação (**Figura 23B e C**).

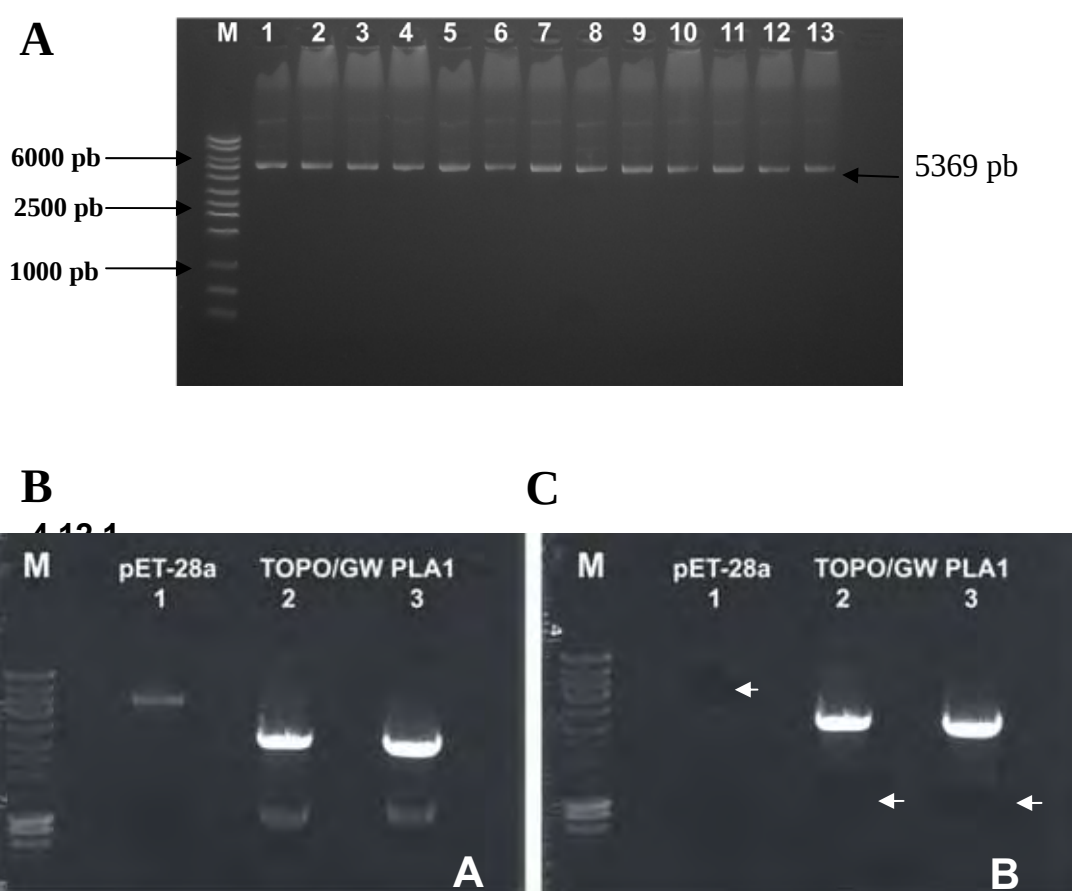


Figura 23. (A) Bandas correspondentes ao DNA plasmidial do vetor pET-28a purificado por meio de “minipreps”, apresentando 5369 pb. A análise foi realizada em gel de agarose 1,5%, em TAE 1x e a amostra visualizada com Blue Green. Em (B, C) tem-se os perfis eletroforéticos em géis de agarose 1% em TAE 1X, das preparações plasmidiais do vetor de expressão pET-28a (1) e da construção plasmidial PLA1_Rec2 (2 e 3). (B) após a reação de digestão dupla com as enzimas *EcoR1* e *Nde I*; (C) mesmo gel após recorte das bandas, as quais foram eluídas e, em seguida utilizadas nas reações de ligação.

A reação de ligação vetor-inserto foi realizada em um período de 20 horas à 4°C, e as células XL1Blue transformadas, por choque térmico, foram semeadas em meio LB-agar/canamicina a 25 µg/mL. Para isso, foram preparadas duas placas, sendo que, uma delas recebeu parte da reação de transformação e a outra, um

concentrado da mesma reação de transformação, obtido por centrifugação das células e ressuspensão em pequeno volume do sobrenante. Como resultado, houve um bom crescimento de transformantes em ambas as placas contendo LB-agar/canamicina a 25 µg/mL. De cada uma delas foram selecionadas 8 colônias que foram repicadas para uma outra placa. Portanto, ao todo foram selecionados 16 clones de pET-28a-PLA1 transformados em *E. coli* XL1Blue. O repique destes clones teve como objetivo manter uma outra placa de transformantes para manipulação direta, afim de diminuir a chance de qualquer tipo de contaminação das placas originais. Destes 16 clones foram crescidos em meio LB líquido com canamicina 25 µg/mL apenas 8 para extração plasmidial e digestão dupla com *EcoRI* e *NdeI* para a confirmação dos insertos (**Figura 24**).

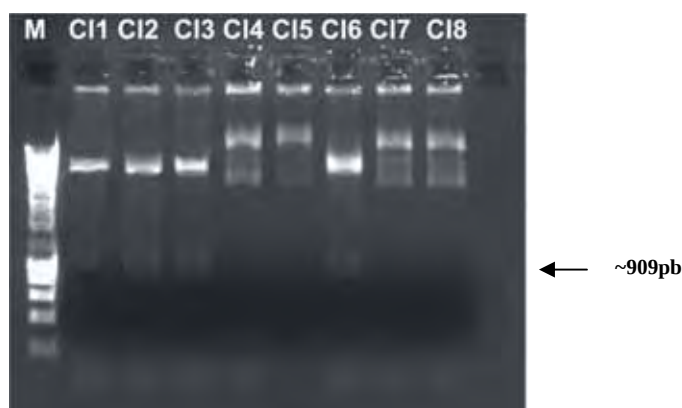


Figura 24. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em TAE 1X, mostrando as preparações plasmidiais de pET-28a_PLA1 após reação de digestão com enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI*. Observar que os clones 1, 2, 3 e 6 apresentaram o inserto de PLA1 com o tamanho esperado de ~ 800 pb, enquanto que nos demais nada foi observado.

As digestões acima foram feitas na forma de testes para confirmar a presença ou não do inserto e assim, determinar quais destes clones poderiam ser usados para transformar as células de expressão *E. coli* BL21-DE3. Por isso, as reações foram realizadas com metade da quantidade das enzimas de restrição e, muito provavelmente por isso, nem todas as digestões ocorreram de forma satisfatória, mas mesmo assim possibilitaram identificar a presença de 4 clones recombinantes desta amostra de 8 clones selecionados.

4.13 Transformação das células BL21-DE3 com os plasmídeos pET-28a-PLA1

Os plasmídeos recombinantes, confirmados por dupla digestão enzimática e provenientes dos clones 1, 2, 3 e 6 foram isolados por mini-preps e utilizados para transformação de células de expressão BL21-DE3. Todos os volumes de cada uma das reações de transformação foram colocados separadamente em placas únicas, sendo que em metade delas foi feito pouco estriamento dos volumes das reações e na outra metade delas um maior estriamento. Desta maneira, metade de cada placa ficou com uma maior concentração de células e a outra metade com uma concentração menor, como pode ser visto, por exemplo na **Figura 25** para o clone 1. Esta estratégia serviu como teste de diluição dos produtos das reações de transformação e também para melhor isolamento de colônias, utilizando-se uma única placa para cada reação, ao invés de se testar diluições seriadas e várias placas.



Figura 25. Crescimento da cultura recombinante de pET28a_PLA1 (proveniente do clone 1) em células *E. coli* BL21- DE3.

4.14 Crescimento das células BL21-DE3 transformadas com plasmídeos pET -28a_ PLA1

Cada proteína recombinante a ser expressa em qualquer sistema, seja procariótico ou eucariótico, tem suas próprias propriedades e particularidades e por isso, é sempre necessário buscar o melhor protocolo, ou pelo menos, aquele que melhor se adeque à proteína de interesse. A expressão heteróloga da enzima do veneno de *P. paulista*, PLA1 recombinante foi delineada de forma que a mesma

fosse expressa com uma cauda de 6 histidinas na sua região N-terminal, sendo esta uma estratégia para facilitar a sua purificação. No entanto, o processo de expressão em si, necessita também ser otimizado. Assim, neste trabalho, foram testadas diferentes condições de indução da expressão por IPTG, bem como de crescimento das células de *E.coli* BL21-DE3. Diferentes concentrações de IPTG (0,1mM, 0,5mM e 1mM.), diferentes temperaturas para cultivo das células bacterianas, pós-indução com IPTG, de 20°C, 25°C, 30°C e 37°C e tempos de indução de expressão de 2h, 4h, 6h, 8h, 12h e 24h.

Todos os clones selecionados (1, 2, 3 e 6) foram submetidos às mesmas condições de cultivo e expressão, porém os melhores resultados foram obtidos com o clone 1. As condições ótimas foram definidas em 1mM de IPTG, 20°C e 6 horas de expressão. A 37°C também foi observada expressão da proteína, porém com uma intensidade bem inferior a que ocorreu em 20°C.

A determinação da solubilidade das proteínas recombinantes é um passo fundamental na continuação dos experimentos de purificação, pois, somente através disso é possível traçar estratégias a serem utilizadas. Desta maneira, as culturas bacterianas que expressavam a PLA1-Rec foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise e sonicadas. Após uma segunda centrifugação, o sobrenadante foi separado em um tubo eppendorff e o precipitado ressuspenso em tampão de amostra do gel, para que ambas as amostras (solúvel e insolúvel) fossem analisadas por SDS-PAGE. A corrida revelou que a PLA1-Rec não estava sendo expressa na forma solúvel, mas estava presente no precipitado, ou seja, nos chamados corpúsculos de inclusão, como pode ser visualizado na **Figura 26**.

Os corpos de inclusão são acúmulos protéicos formados devido ao grande nível de expressão da proteína recombinante em *E.coli*. Geralmente, as proteínas expressas desta forma não apresentam atividade biológica e necessitam de um processo elaborado de solubilização, recuperação da estrutura protéica e purificação para recuperar a funcionalidade biológica (SINGH; PANDA, 2005).

Os pesquisadores têm proposto várias alternativas para minimizar a formação destes agregados, tais como diminuições da temperatura de expressão e aumento da concentração de indutor, as quais, foram testadas neste estudo, porém não foram suficientes para aumentar o nível de expressão protéica na forma solúvel.

Entretanto, a expressão em tais agregados também tem suas vantagens. As proteínas geralmente apresentam um nível muito alto de expressão, podendo chegar

a até 30% da proteína celular em alguns casos, apresentam menor degradação da proteína expressa, possuem resistência ao ataque proteolítico pelas proteases celulares e a maior homogeneidade da proteína de interesse, auxiliando ainda na redução de etapas de purificação para recuperar a proteína pura (WALSH, 2006).

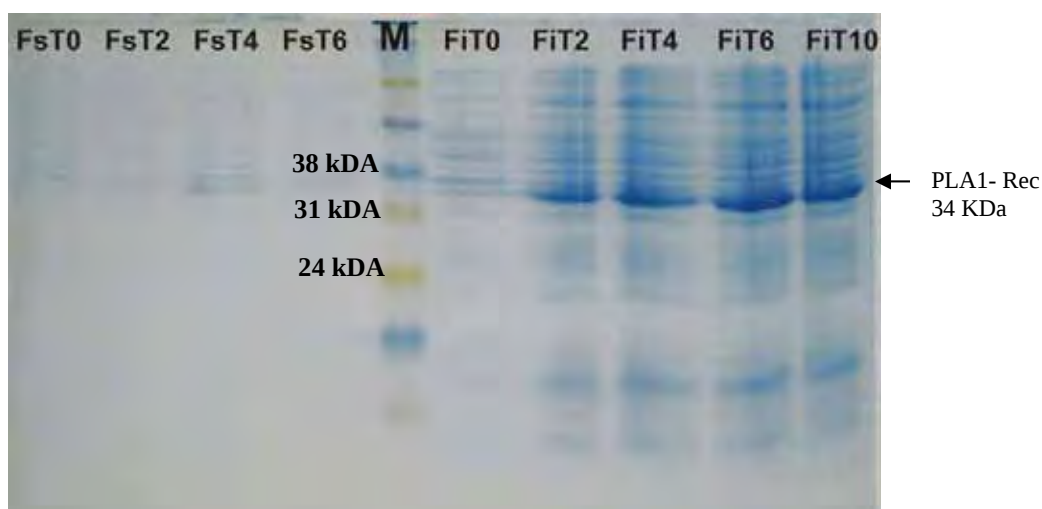


Figura 26. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 15% das proteínas totais extraídas da cultura de bactérias a partir do clone 1 (Frações solúveis – Fs e Frações insolúveis – Fi), após os diferentes tempos de expressão da proteína recombinante PLA1. À esquerda, tem-se as Fs dos tempos 0, 2, 4 e 6 horas, à direita as Fi dos tempos 0, 2, 4, 6 e 10 horas. Observar presença da banda protéica mais intensa de 34 kDa nas frações insolúveis e sua ausência na Fi do tempo 0. As proteínas do gel foram coradas com Coomassie Blue G-250. M corresponde ao marcador de massa molecular de 12 a 225 kDa.

4.15 Purificação da proteína recombinante PLA1-Rec

Diversos protocolos foram testados visando obter um melhor nível de purificação da proteína recombinante, porém os melhores resultados foram conseguidos quando a lise das células foi realizada em tampão desnaturante contendo uréia a 8 M. Sendo assim, foi possível solubilizar de modo mais eficiente, os corpúsculos de inclusão presentes na fração insolúvel do lisado celular. Uma vez obtida a fração solubilizada dos corpos de inclusão, em que a proteína PLA1 recombinante contendo cauda de histidina estava presente, foi então possível prosseguir para o processo de purificação da proteína, por cromatografia de afinidade em resina de agarose- Ni^{2+} (Ni-NTA-Agarose), na qual, ocorrem ligações específicas do íon Níquel com os resíduos de histidina da proteína. A seguir a eluição específica da proteína pode ser feita por competição com um gradiente de imidazol ou por competição de cargas, por meio de um gradiente decrescente e

gradual de pH, com o qual a resina vai diminuindo sua capacidade de ligação. No caso da PLA1-Rec deste trabalho, o melhor resultado de purificação foi obtido quando a eluição da coluna de afinidade foi realizada com tampões de lavagens apresentando uma diminuição gradual de pH e a proteína foi eluída a pH 4,5 (**Figura 27**). Quando a eluição foi realizada com gradiente de imidazol, uma maior porcentagem de bandas protéicas contaminantes pode ser observada (resultados não mostrados).

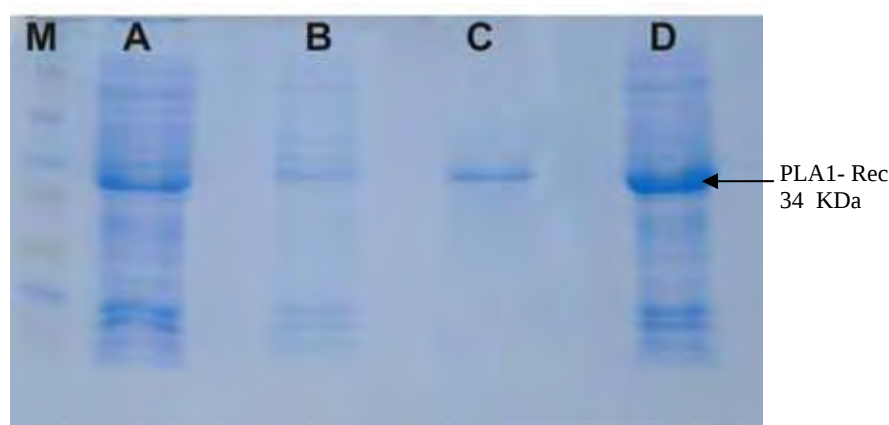


Figura 27. Perfil protéico, em SDS-PAGE a 15%, das etapas de purificação da proteína recombinante PLA1 com cauda de histidina, em coluna de afinidade Ni-NTA-Agarose, previamente equilibrada com tampão 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 0,5 M de NaCl, 5 mM de B. mercaptoetanol, 5 mM de imidazol e 8 M de uréia. Em **A**, estão as proteínas que não se ligaram na resina; em **B**, fração obtida após lavagem da coluna com tampão de lavagem (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 6.3). Em **C** a proteína purificada, a qual foi eluída em tampão 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 4.5 e em **D**, perfil das proteínas totais da fração solubilizada dos corpúsculos de inclusão antes da purificação. A coloração do gel foi feita com Coomassie Blue G-250. **M** representa o marcador de massa molecular de proteínas de 12 a 225 kDa.

Na **Figura 27**, é possível observar que os perfis das canaletas **A** e **D** são praticamente idênticos, a não ser pela menor intensidade da banda de PLA1-Rec na canaleta **A**. Sendo estas duas amostras, respectivamente correspondentes às proteínas que não se ligaram a resina (em **A**) e às proteínas totais da fração solubilizada dos corpúsculos de inclusão antes da purificação (em **D**), estes resultados indicam que provavelmente neste caso, as proteínas podem não ter se ligado totalmente à resina de afinidade Agarose-Ni, devido ao pouco tempo que ficaram incubadas com a mesma, ou porque a quantidade de proteínas aplicadas à resina tenha sido maior do que sua capacidade de interação. No entanto, esta última hipótese parece ser menos provável, já que segundo o fabricante, a capacidade de ligação desta resina é de 50mg de proteínas com cauda de histidina/mL de resina.

Segundo Dill (1991) as proteínas solubilizadas do corpo de inclusão a partir de agentes caotrópicos como a uréia, resultam na perda de sua estrutura secundária e em consequência, numa conformação aleatória de sua estrutura, com possível exposição de sua região hidrofóbica na sua superfície, o que dificulta a interação por cargas. Mas um dos mais fortes impedimentos da ocorrência de interação dos átomos carregados de Ni^{2+} aos resíduos de histidina, acoplados à proteína recombinante, é a dificuldade de acesso pelo níquel a estes resíduos caso estejam interiorizados na molécula, além, ainda da possibilidade da perda de resíduos de histidina da molécula, durante a lise das células pelo processo de sonicação.

Embora ainda com baixo rendimento pelo processo de purificação aqui utilizado, mas tendo em mãos um dos principais alérgenos do veneno de *P. paulista* – a PLA1 – na forma recombinante, abre-se um leque de perspectivas para estudos sobre: seu mecanismo de ação bioquímico e imunogênico, a determinação de sua estrutura por cristalografia de raios x e principalmente sua potencialidade de atuação como vacina recombinante alérgeno – específica a ser utilizada contra os efeitos nocivos deste potente alérgeno.

4.16 Análise da especificidade dos anticorpos policlonais anti-PLA1 natural no reconhecimento da PLA1-Rec.

Para análise da especificidade dos anticorpos policlonais anti-PLA1 natural no reconhecimento da proteína recombinante foi realizada a estratégia de um *Western Blotting* com o veneno bruto de *P. paulista* e uma alíquota da fração solubilizada dos corpúsculos de inclusão, contendo a PLA1-Rec (**Figura 28**).

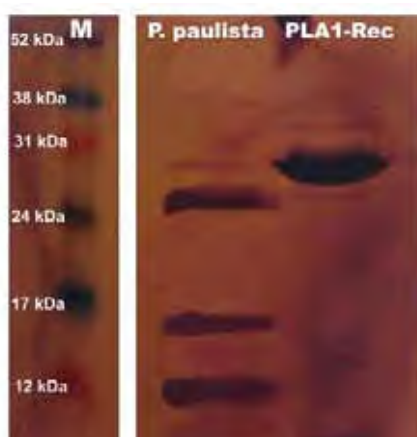


Figura 28. Resultado de *Western Blotting* realizado com anticorpos policlonais anti-PLA1 natural (fração eletroforética protéica) mostrando o reconhecimento da PLA1-Rec proveniente da fração solubilizada dos corpúsculos de inclusão, demonstrando a especificidade destes anticorpos.

Estes resultados são muito importantes, pois mostraram que os anticorpos policlonais produzidos se mostraram específicos no reconhecimento da proteína recombinante, mesmo sendo produzidos a partir das isoformas de PLA1 de massa molecular diferentes. Outro ponto importante, é que essa fração protéica transferida para a membrana de nitrocelulose foi obtida com um tratamento de 8 M de uréia para solubilização dos corpúsculos de inclusão, no qual as proteínas recombinantes sofrem completo ou parcial desdobramento na sua estrutura (CLARK, 2001). Entretanto, mesmo assim os anticorpos foram capazes de reconhecer e se ligar a epítomos específicos da PLA1-Rec.

Os anticorpos policlonais mostraram-se específicos muito provavelmente pelo fato das diferentes isoformas das PLAs1 apresentarem grande similaridade de resíduos de aminoácidos, serem extremamente conservadas evolutivamente e pelo fato da desnaturação evidenciar epítomos que poderiam estar interiorizados na estrutura protéica (JAMES et al., 2003).

Os resultados obtidos com o *imunoblotting* permitem dizer que a proteína alergênica expressa em *E. coli* manteve sua característica imunogênica, porém novos ensaios devem ser realizados para verificar se o potencial imunogênico da PLA1-Rec é comparável ao do alérgeno natural, caso isso aconteça o alérgeno recombinante será capaz de proporcionar uma maior especificidade aos testes cutâneos de diagnóstico.

Discussão Geral

5. DISCUSSÃO GERAL

Acidentes envolvendo insetos sociais da ordem Hymenóptera são comuns em todo o mundo e a complexidade dos componentes no veneno destas espécies faz com que eles despertem grande interesse voltado à investigação na área médica (GOLDEN, 2005). Uma pessoa ferroadada por grande quantidade destes insetos pode sofrer reações sistêmicas capazes de leva - lá a morte (KOLECKI, 1999).

Dentre os principais compostos dos venenos de himenópteras sociais, atenção maior é dada às proteínas por serem reconhecidas como importantes alérgenos (PANTERA et al., 2003). As proteínas de maior interesse e que são encontradas em maior abundância no veneno de vespas, incluindo a espécie aqui estudada, *P. paulista*, são as fosfolipases A1, hialuronidase e o antígeno 5 (KING, et al., 1983; CARDOSO et al., 2003, HOFFMAN, 2006).

As fosfolipases (PLAs) atuam sobre os fosfolipídios de membrana causando formação de poros, lise celular e dano tecidual (DOTIMAS, HIDER, 1987). São enzimas comuns em uma grande gama de venenos animais, sendo a PLA2 abundante em venenos de abelhas (OLIVEIRA, PALMA, 1998; COSTA, PALMA, 2000;) enquanto a PLA1 é relativamente comum em venenos de vespas (HOLFFMAN, 1996).

Técnicas proteômicas e moleculares desempenham um papel importante e complementar nos estudos de caracterização molecular, estrutural e funcional de moléculas biológicas provenientes de diferentes fontes e que possam ser utilizadas para aplicações biotecnológicas e farmacológicas. O estudo dos componentes dos venenos animais são exemplos característicos deste enfoque. Desta forma Santos et al. (2007) por meio de técnicas proteômicas, purificaram, sequenciaram e caracterizaram estruturalmente a PLA1 do veneno de *P. paulista*. Já em nosso trabalho, utilizando técnicas moleculares de amplificação de cDNA, clonagem e expressão heteróloga em procarioto, determinamos a sequência completa do cDNA de PLA1 da mesma vespa sendo sua sequência de aminoácidos deduzida por tradução.

O alinhamento entre as duas proteínas - a determina por Santos et al. (2007) e a do atual estudo - revelou diferenças de 87 resíduos de aminoácidos (71% de similaridade) que podem ser explicados pelo polimorfismo naturalmente existente entre indivíduos da mesma espécie, uma vez que grande quantidade de vespas

foram utilizadas para determinação da sequência de cDNA. Entretanto uma identidade de 95% foi encontrada entre as duas sequências de nucleotídeos determinadas para a PLA1 nos dois estudos. Os modelos tridimensionais da estrutura de PLA1 determinada por proteômica e por estudos moleculares foram construídos com base em um mesmo *template* (lipase pancreática de cobaias – PDB 1GPL) ambas apresentam uma formação do tipo sanduíche beta. No entanto, Santos et al. (2007), encontraram um enovelamento de seis fitas β -paralelas e uma antiparalela envolvidas por quatro α -hélices e em contraste no atual estudo o modelo revelou oito fitas β -antiparalelas ligadas a sete α -hélices e loops. O que provavelmente deve ser consequência das diferenças de aminoácidos entre as duas proteínas.

Recentemente, Santos et al. (2011), utilizando uma combinação de técnicas como eletroforese bidimensional, MALDI-TOF/TOF MS e protocolos clássicos como a Química Degradativa de Edman identificaram oito diferentes isoformas para as PLAs1 no veneno de *P. paulista* (spots I, III, IV, VI, VII, VIII, IX e X) e duas para a PLA2 (spots II e V). Segundo a autora, o spot X seria o único correspondente a PLA1 madura (34 kDa) enquanto que os outros sete podem corresponder a formas truncadas da proteína. Uma análise mais detalhada destes fragmentos demonstra que suas sequências podem ser encontradas dentro da sequência de aminoácidos da proteína completa.

A natureza destas diferentes isoformas ainda não foi totalmente esclarecida, mas segundo Banks e Shipolini, 1986 ela pode ser devido à foto-oxidação do grupo imidazol dos resíduos de histidina ou do conteúdo de carboidratos. Altman et al. (1990) estudando a origem da heterogeneidade das três isoformas de PLA2 já descritas no veneno de *Apis mellifera* evidenciou que as diferenças entre elas estava associada ao número e aos tipos de carboidratos ligados.

Quando a sequência da proteína PLA1 aqui estudada é comparada à sequência da proteína madura de 34 kDa, descrita por Santos et al. (2007) verificamos que elas são idênticas em relação as regiões N- e C- terminais. Entretanto, nas regiões internas é possível observar 87 resíduos de aminoácidos diferentes, sem que isso leve a uma diferença significativa da massa molecular entre elas, porém o ponto isoelétrico encontrado para as duas foi diferente, sendo o do atual estudo 9,1 o encontrado por Santos et al. (2011) próximo a 4,0. Com base nesses valores podemos inferir que os 87 aminoácidos diferentes para a sequência

em estudo lhe conferem um caráter mais básico, sendo esses aminoácidos Arginina, Histidina e Lisina.

Estudos sobre imunoreatividade cruzada são de extrema importância em pesquisas de alérgenos dos venenos de himenópteros sociais. Muitas vezes um mesmo alérgeno pode ser reconhecido por anticorpos produzidos contra um antígeno de outro veneno. Essa dupla positividade causa problemas de diagnóstico e dificulta o tratamento imunoterápico de pacientes que não reconheceram o inseto causador da ferroadada (ERZEN et al., 2009). Por outro lado, a imunoreatividade cruzada de um determinado alérgeno, como encontrado em nosso estudo, revela a possibilidade benéfica de uso do mesmo anticorpo no tratamento de pacientes ferroadados pelos diferentes insetos. Os resultados aqui obtidos indicam que pacientes sensibilizados com veneno de *P. paulista* desenvolvem anticorpos capazes de reconhecer a proteína alergênica PLA1 em venenos de outros insetos sociais, principalmente no veneno de *Polistes lanio lanio*. Estes dados necessitam de maiores esclarecimentos e do uso de diferentes estratégias de análise, como por exemplo, Elisa (Enzyne Linked Imuno Sorbent Assay), já que o imunoblotting é uma técnica limitada para uma caracterização imunológica mais precisa.

A obtenção e purificação de um determinado alérgeno natural dos venenos de vespas é um processo complicado, de baixo rendimento e muitas vezes dispendioso. Na maior parte das vezes a purificação ocorre de forma parcial com traços de algumas outras moléculas (MULLER, 2001). Como alternativa, a produção de alérgenos recombinantes é uma estratégia eficiente para a obtenção de grandes quantidades de material puro e de forma relativamente rápida permitindo a realização de estudos sobre o potencial biológico da proteína alergênica.

Soldatova et al. (1998), expressaram a enzima hialuronidase do veneno de abelha em sistema heterólogo de *E. coli* e não obtiveram a mesma atividade alergênica que a exibida pela proteína natural, porém quando expressaram em células de inseto, as proteínas sofreram modificações pós-traducionais, resultando em uma atividade alergênica semelhante ao do alérgeno natural. King et al., 1996, também expressaram em *E. coli* a fosfolipase A1 da vespa *Yellow jacket*, obtendo uma menor atividade alergênica quando comparada a fosfolipase A1 natural, sugerindo que a PLA1 não tenha sido enovelada corretamente. Desta forma é possível dizer que tais modificações são essenciais para o enovelamento correto da molécula e para as conformações dos epítomos de reconhecimento e ligação ao IgE.

No atual trabalho a PLA1 recombinante de *P. paulista* também foi produzida em *E. coli* e embora mais testes ainda sejam necessários para que a PLA1-Rec possa ser utilizada em diagnósticos clínicos e na imunoterapia, um resultado importante aqui obtido foi que os anticorpos produzidos contra a fração eletroforética da PLA1 natural do veneno da vespa foram capazes de reconhecer e se ligar à proteína recombinante indicando que alguns dos seus epítomos continuaram disponíveis mesmo que o enovelamento correto não tenha ocorrido.

O elevado número de reações alérgicas causadas por ferroadas de *P. paulista* no Brasil evidencia a necessidade de maiores pesquisas para aprofundamento dos conhecimentos bioquímicos sobre os alérgenos das vespas sociais (LIMA, BROCHETTO-BRAGA, 1994), bem como, para a utilização dos alérgenos recombinantes para a imunoterapia, o que representa uma das principais perspectivas deste trabalho.

Se testes posteriores confirmarem o potencial imunológico da PLA1 recombinante ela representará um importante avanço na área da Imunologia clínica no Brasil, uma vez que os alérgenos disponíveis para testes de diagnóstico na sua grande maioria são de espécies de vespas originárias do hemisfério norte e, além disso, a proteína recombinante poderá determinar a verdadeira relevância clínica de um alérgeno individual livre de contaminação. Finalmente, o uso isolado ou de combinações de alérgenos recombinantes para diagnóstico e tratamento de alergias a venenos de himenópteras é promissor para um futuro próximo.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A sequência de cDNA da PLA1 madura do veneno de *P. paulista* apresenta 985 pb. A proteína traduzida mostra-se conservada quando comparada com outras fosfolipases A1 disponíveis no Banco de Dados, possuindo 302 aminoácidos e massa molecular estimada em 33 kDA, pertencendo à super família das esterases lipases, possuindo sítio-ativo localizado entre os resíduos 131 a 140 composto por 10 aminoácidos. Na tríade catalítica encontram-se os resíduos de His226, Asp167 e Ser137.
- O anticorpo produzido contra a fração eletroforética de PLA1 do veneno da vespa mostrou-se específico reconhecendo as diferentes isoformas de PLA1 descritas por Santos, 2007 e revelando ainda a possibilidade de existência de mais uma isoforma desta proteína.
- Os elevados níveis de conservação e similaridade possibilitaram a ocorrência de imunoreatividade cruzada entre os alérgenos de PLA1 do veneno de outras vespas sociais mas o maior nível de reação ocorreu com o veneno de *Polistes lanio lanio*, indicando que pessoas alérgicas ao veneno desta vespa podem ser tratados com IT usando veneno de *P. paulista*.
- O alérgeno PLA1-Rec expresso em *E. coli* BL21 BE3 se apresenta na forma de precipitados, ou seja, nos chamados corpúsculos de inclusão, os quais necessitam passar por um processo mais detalhado de solubilização para obtenção da proteína recombinante na forma pura.
- O Anticorpo produzido contra a fração de PLA1 do veneno bruto de *P. paulista* foi capaz de reconhecer a proteína PLA1-Recombinante, indicando que mesmo nesta forma esta proteína exibe propriedades imunológicas.
- Muitos estudos bioquímicos, moleculares ou imunológicos poderão ser realizados a partir da obtenção do alérgeno PLA1-Rec para obtenção de outros compostos como uma vacina recombinante para imunoterapias.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMANN, F.; KUBELKA, V.; STAUDACHER, E.; UHL, K.; LEOPOLD, M. Characterization of the isoforms of phospholipase A2 from honeybee venom. **Insect Biochem**, v. 21, n. 5, p. 467-472, 1991.
- ANTONICELLI, L.; BILO, M.B.; BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. **Curr Opin Allergy Immunol**, v. 2, n. 4, p. 341-346, 2002.
- BANEYX F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia Coli*. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 11, p. 1399-408, 2004.
- BANKS, B. E. C.; SHIPOLINI, R. A. **Chemistry and pharmacology of honeybee venom**, in: T. Piek (Ed.), *Venoms of the Hymenoptera*, Academic Press, Orlando, 1986, pp. 319– 415.
- BARNARD, J. H. Studies of 400 Hymenoptera sting deaths in the United States. **J Allergy Clin Immunol**, v. 52, n. 5, p. 257-264, 1973.
- BILÓ, B. M.; RUEFF, F.; MOSBECH, H.; BONIFAZZI, F.; OUDE-ELBERINK, J. N. G. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. **Allergy**. v. 60, n. 11, p. 1339-1349, 2005.
- BORODINA, I.; JENSEN, B. M.; WAGNER, T.; HACHEM, M. A, POULSEN, L. K; SONDERGAARD, I. Expression of enzymatically inactive wasp venom phospholipase A1 in *Pichia pastoris*. **PLoS One**. v. 6, n. 6, p. e21267, 2011.
- BOUSQUET, J.; HUCHARD, G.; MICHEL, F. B. Toxic reactions induced by Hymenoptera venom. **Ann Allergy**, v. 52, n. 5, p. 371-374, 1984.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 7, p. 248-254, 1976.
- BREITENEDER, H.; SOWKA, S.; WAGNER, S.; KREBITZ, M.; HAFNER, C. KINACIYAN, T. Cloning of the patatin-like latex allergen Hev b 7, its expression in the yeast *Pichia pastoris* and its immunological characterization. **Int Arch Allergy Immunol**, v.118, p. 309-10, 1999.
- BRINDLEY, D. N.; ENGLISH, D.; PILQUIL, C. Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1582, p. 33–44. 2002.
- CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2003. 468 p
- CASTRO, F. F. M. **Reações alérgicas por venenos de Hymenoptera: experiência de 20 anos**. Tese (Livre-Docência - Disciplina de Alergia e Imunopatologia) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 132 p, 2001

CHALMERS, J. J.; KIM, E.; TELFORD, J. N. *et al.* Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 1, p. 104-11, 1990.

CHEN, S. C. A.; WRIGHT, L. C.; GOLDING, J. C.; SORREL, T. C. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochem J**, v. 347, p. 431-439, 2000.

CHOI, J.; KEUM, K.; LEE, S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chem Eng Sci**, v. 61, n. 3, p. 876-885, 2006.

CLARK, E. Protein refolding for industrial processes. **Curr Opin Biotechnol**, v. 12, n. 2, p. 202-207, 2001.

COSTA, H.; PALMA, M. S. Agelotoxin: a phospholipase A2 from the venom of the neotropical social wasp cassununga (*Agelaia pallipes pallipes*) (Hymenoptera-Vespidae). **Toxicon**, v. 38, n.10, p.1367–1379, 2000.

DELANO, W.L. **The PyMOL User's Manual**. DeLano Scientific, Palo Alto, 2004.

DILL, K. A.; SHORTLE, D. Denatured states of proteins. **Annu Rev Biochem**, v. 60, p. 795-825, 1991.

DOTIMAS, E., HIDER, R. C. Honeybee venom. **Bee World**, v. 68, p. 51–71. 1987

ERZEN, R.; KOROSSEC, P.; SILAR, M.; MUSIC, E.; KOSNIK, M. Carbohydrate epitopes as a cause of cross-reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom. **The Middle European Journal of Medicine**, v. 121, p. 349-352, 2009.

EVANS, H. E.; WEST-EBERHARD, M. J. **The wasp**. Ann Arbor: Univ. Mich. Press., 1970, 265 p.

FARRELL, A. M.; TAYLOR, D.; HOLLAND, K. T. Cloning, Nucleotide Sequence Determination and Expression of the *Staphylococcus aureus* Hyaluronate Lyase Gene. **FEMS Microbiol Lett**, v. 130, p. 81-85, 1995.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. O; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. **J Mol Catal**, v. 30, p. 43-49. 2004.

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORREL, T.; WILMER, F.; WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes Infect**, v. 8, n. 4, p. 1006-1015, 2006.

GMACHL, M.; KREIL, G. The precursor of the bee venom constituents' apamin and MCD peptide are encoded by two genes in tandem which share the same 3'exon. **J Biol Chem**, v. 270, n. 21, p. 12704-12708, 1995.

GODDARD, J. **Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance**. Boca Raton: CRC Press, v. 4, 2003. 480p.

GOLDEN, D. B.; MARSH, D. G.; FREIDHOFF, L. R.; Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. **J Allergy Clin Immunol**, v. 100, p. 760-766, 1997.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Electrophoresis of proteins**. 2 ed. New York: [s.n], 1990. 383 p

HANAHAN, D. J.; CHAIKOFF, I. L. A new phospholipid-splitting enzyme specific for the ester link age between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. **J Biol Chem**, v. 169, p. 699–705, 1947.

HARDEN, T. K.; SONDEK, J. Regulation of Phospholipase C Isoenzymes by Ras Superfamily GTPases. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, v. 46, p. 355-379, 2006.

HEINIG, J. H.; ENGEL, T.; WEEKE, E. R. Allergy to venom from bee or wasp: the relation between clinical and immunological reactions to insects stings. **Clin Allergy**, v. 18, p. 71-78, 1988.

HO, C. L.; HWANG, L. L.; LIN, Y. L. CHEN, C. T.; YU, H. M.; WANG, K. T. Cardiovascular effects of mastoparan B and its structural requeriments. **Eur J Pharmacol**, v. 259, n. 3, p.259-264, 1994.

HOFFMAN, D. R. Allergens in Hymenoptera venoms. Identification of allergen B of bee venom acid fosfatase. **J Allergy Clin Immunol**, v. 59, n. 5, p. 364-366, 1977.

HOFFMAN, D. R.; JACOBSON, R. S Allergens In Hymenoptera venom. XXVII: bumblebee venom allergy and allergens. **J Allergy Clin Immunol**, v. 97, n. 3, p. 812-821, 1996.

HOFFMAN, D. R. Hymenoptera Venom Allergens. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 30, n. 2, p. 109-128, 2006.

JAMES, L. C.; ROVERSI, P.; TAWFIK, D. S. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. **Science**. v. 299, p. 1362-1367. 2003

JENKINS, G. M.; FROHMAN, M. A. Phospholipase D: a lipid centric review. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, p. 2305-2316, 2005.

JEVSEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA I, PODOBNIK B, GRDADOLNIK J, MENART V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnol Prog**, v. 21, n. 2, p. 632-9. 2005

KING, T. P.; JIM, S. Y.; WITTKOWSKI, K. M. Inflammatory role of two venom components of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): a mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 131, n. 1, p. 25-32, 2003.

KING, T. P.; JIM, S. Y.; MONSALVE, R. I. *et al*. Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen 5s. **J Immunol**, v. 166, n. 10, p. 6057-65, 2001.

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**, v. 98, p. 588-600, 1996.

KING, T. P.; ALAGON, A.C.; KUAN, J.; SOBOTKA, A.K.; LICHTENSTEIN, L. M. Immunochemical studies of yellow jacket venom proteins. **Mol Immunol**, v. 20, p. 297-308, 1983.

KINI, R. M; Excitement ahead: Structure, function and mechanism as snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KOLECKI, P. Delayed toxic reaction following massive bee envenomation. **Ann Emerg Med**, v. 33, p. 114-116. 1999.

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

KUDO, I. Diversity of Phospholipase A2 Enzymes. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 8, p. 1157, 2004.

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

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Res**, v. 24, p. 2 -12. 2006.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J App Cryst**, v. 26, p. 238-291, 1993.

LIMA, P. R. M. DE; BROCHETTO-BRAGA, M. R. **Caracterização de serina-proteases em venenos de diferentes subespécies de Apis mellifera (Hymenoptera-Apidae)**. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, n. 6, 1994, Guaratinguetá, Resumos. São Paulo: UNESP, 1994, p 135

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

LU, G. 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**, v. 270, p. 4457-4465, 1995.

MANZOLI-PALMA, M. F.; PALMA, M. S. Aspectos entomológicos das alergias provocadas por ferroadas de Hymenoptera sociais. **ASBAI**, v. 15, n. 4, p. 123-125, 1992.

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

MOSBECH, H; MULLER, U. Side-effects of insect venom immunotherapy: results from an EAACI multicenter study. **Allergy**, v. 55, n. 11, p. 1005-1010, 2000.

MULLER, U. R.; SOLDATOVA, L.; WEBER, M. Bee venom allergy: Comparison of IgE-binding capacity of purified natural and recombinant-synthetic venom allergens. **J Allergy Clin Immunol**, v. 101, p. 33, 1998.

MULLER, U. R. New developments in the diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 124, p. 447-53, 2001.

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

MURAKAMI, M. Hot topics in phospholipase A2 field. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 8, p. 1179-1182, 2004.

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

NELSON, D. L.; COX M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed, Artmed, 2011. 1304 p.

NITTNER-MARSZALSKA, M.; LIEBHART, J.; LIEBHART, E.; DOR, A.; OBOJSKI, A. Prevalence of Hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland. **Med Sci Monit**, v. 10, n. 7, p. 324-329, 2004.

OZDEMIR, C.; KUCUKSEZER, U. C.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. **Clin Exp Allergy**, v. 41, n. 9, p. 1226-34, 2011.

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

OLIVEIRA, T. C. **Mudanças conformacionais envolvidas na ativação interfacial de fosfolipases A2 – uma análise computacional**, 2006. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J., et al. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Eng**, v. 5, n. 3, p.197-211, 1992.

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*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1623, p.72-81, 2003.

PASTORELLO, E. A.; INCORVAIA, C.; MAURO, M.; RIARIO-SFORZA, G. G.; BERARDIRNELLE, C.; PRAVETTONI, V. Anaphylaxis from insect stings: An underestimated problem? **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 10, n. 2, p. 91-93, 1997.

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

RADIN, N. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. **Biochem J**, v. 371, p. 243-56, 2003.

REBECCHI, M. J.; PENTYALA, S. N. Structure, Function, and Control of phosphoinositide- specific phospholipase C. **Physiol Rev**, v. 80, n. 4, p. 1291- 1335, 2000.

REISMAN, R. E.; LIVINGSTON, A. Late-onset allergic reactions, including serum sickness, after insect stings. **J Allergy Clin Immunol**, v. 84, p. 331-337, 1989.

RICHARDS, O. W.; DAVIES, R. G. **Tratado de entomologia Imms: Classification y Biologia.**, Ed. Omega S. A., Barcelona, Espanha, 1984. 988 p.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction os Spatial Restraints. **J Mol Biol**, v. 234, p. 779-815, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**, 3 ed., Cold Spring Harbor, New York, 2001.

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

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

SANTOS, L. D.; MENEGASSO, A. R.; SANTOS PINTO, J. R.; SANTOS, K. S.; CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp Polybia paulista. **Proteomics**, v. 11, p. 1403-1412. 2011

SANTOS-FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Quim Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCHMIDT, J.O. Biochemistry of insect venoms. **Ann Rev Entomol**, Stanford, v. 27, p. 339-368, 1982.

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

SHILKIN, K. B.; CHEN, B. T. M.; KHOO, O. T. Rhabdomyolysis caused by hornet venom. **Br Med J**, v. 793, p. 156-157, 1972.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **J Biosci Bioeng.** v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

SOLDATOVA, L. N.; CRAMERI, R.; GMACHL, M.; KEMENY, D. M., SCHMIDT, M.; WEBER, M. et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus- infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. **J Allergy Clin Immunol**, v. 101, p. 691–698, 1998.

SONG, J. K; RHEE J. S. Enhancement of stability and activity of phospholipase A1 in organic solvents by directed evolution. **Biochim Biophys Acta**, v. 1547, p. 370-378, 2001.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microb Cell Fact**, v. 4, n. 1, p. 1, 2005.

SOUZA, B. M. **Peptídeos policatiônicos do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Polistinae): estrutura e função**. 2002. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, 2002.

STURM, G; KRANKE, B; RUDOLPH, C; ABERER, W. Rush Hymenoptera venom immunotherapy: A safe and practical protocol for high-risk patients. **J Allergy Clin Immunol**, v. 110, p. 928-933, 2002.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expr Purif.** v. 28, n.1, p. 1-8, 2003.

VARALDA, D. B.; CASTRO, F. F. M. Indicações de imunoterapia alérgeno-específica. In: CASTRO, F. F. M; GALVÃO, C. E. **Imunoterapia**. Barueri: Manole, 2011. p. 45-54.

VASINA, J. A.; BANEYX, F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. **Protein Expr Purif**, v. 9, n. 2, p. 211-8, 1997.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: biochemistry and Biotechnology**. 2 ed. England: John Wiley & Sons; 2004.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2006. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 769-776, 2006.

WILSON, L.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. *et al.* Effect of lipase–lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. **Enzyme Microb Technol**, v. 39, n. 2, p. 259-264, 2006.

WITHERS-MARTINEZ, C.; CARRIÈRE, F.; VERGER R.; BOURGEOIS, D.; CAMBILLAU, C. A pancreatic lipase with a phospholipase A1 activity: crystal structure of a chimeric pancreatic lipase-related protein 2 from guinea pig. **Structure**, v. 4, n.11, p. 1363-1374, 1996.

YANG, H.; XU, X.; MA, D.; ZHANG, K.; LAI, R. A phospholipase A1 platelet activator from the wasp venom of *Vespa magnifica* (Smith). **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 289-96, 2008.

Franco Dani Campos Pereira

Márcia Regina Brochetto Braga