
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIEL HIDEKI IZUKA MORAES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO ANTÍGENO 5 DO VENENO
DA VESPA NEOTROPICAL *Apoica pallens*
(HYMENOPTERA, VESPIDAE)**



Rio Claro
2019

GABRIEL HIDEKI IZUKA MORAES

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
ANTÍGENO 5 DO VENENO DA VESPA NEOTROPICAL *Apoica pallens*
(HYMENOPTERA, VESPIDAE)

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Coorientador: Dr. Amilcar Pérez Riverol

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

Rio Claro
2019

M827i	<p>Moraes, Gabriel Hideki Izuka</p> <p>Identificação e caracterização molecular do antígeno 5 do veneno da vespa neotropical <i>Apoica pallens</i> (Hymenoptera, Vespidae) / Gabriel Hideki Izuka Moraes. -- Rio Claro, 2019</p> <p>47 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientador: Mario Sergio Palma Coorientador: Amilcar Pérez Riverol</p> <p>1. Bioquímica. 2. Proteínas. 3. Hymenoptera. 4. Alergia. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Mario, por oferecer a oportunidade de desenvolver este trabalho, abrindo as portas do seu laboratório e dedicando um tempo para compartilhar um pouco de seu imenso conhecimento.

Ao meu coorientador, Amilcar, pelo acompanhamento neste e em outros projetos. Obrigado por me mostrar como é ser pesquisador e me dar dicas valiosas sobre minha trajetória profissional. Seus ensinamentos serão lembrados para sempre com carinho.

Ao Beto pela paciência imensurável ao me guiar nos experimentos. Não deve ter sido fácil. Seu conhecimento foi imprescindível para a estruturação deste trabalho e a entrega destes resultados. Mostrou-se também um excelente companheiro para conversas.

À minha família – Eliza, Edson e Fábio – pelo apoio incansável. Os vários momentos de estresse não foram suficientes para abalar a confiança depositada em mim por vocês. Não tenho palavras para agradecer, nem para descrever o quanto isso foi importante.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica – Carol, Fran, Gabi, Bibi, Victor – por toda a ajuda e pelos papos entre um protocolo e outro.

A todos os meus amigos pelas incontáveis risadas, pelos inestimáveis momentos de descontração e pelas profundas reflexões sobre a vida.

Às agências financiadoras CNPq, FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro deste e de tantos outros projetos de pesquisa que sustentam a ciência no Brasil.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O antígeno 5 (Ag 5) é uma das proteínas mais comuns no veneno de vespas sociais. Embora sua função biológica seja desconhecida, o Ag 5 possui grande importância clínica por ser um dos componentes do veneno com maior potencial de causar reações de hipersensibilidade em pessoas alérgicas. O correto diagnóstico e o tratamento de casos de alergia envolvem o uso de alérgenos purificados para a identificação da espécie responsável pela sensibilização primária, o que, por sua vez, requer extensos trabalhos de caracterização molecular das proteínas do veneno. No Brasil, no entanto, há uma carência de dados sobre os alérgenos de espécies nativas de relevância clínica. Neste trabalho, foram utilizadas estratégias proteômicas e bioinformáticas para identificar e caracterizar o Ag 5 (Apo p 5) da vespa social *Apoica pallens*. A proteína foi identificada por SDS-PAGE e purificada por cromatografia líquida de troca catiônica, seguido de digestões *in gel* e em solução com enzimas proteolíticas. Os peptídeos gerados foram identificados por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF e ESI-QToF e comparados com sequências de Ag 5 de referência até a obtenção da estrutura primária completa do Apo p 5. Ferramentas *in silico* permitiram modelar a estrutura 3D do Apo p 5 e prever possíveis modificações pós-traducionais. Como resultado, obteve-se uma proteína com 207 resíduos de aminoácidos, massa teórica de 23 kDa e alta identidade com o Ag 5 de espécies da subfamília Polistinae. Ensaios de *immunoblot* confirmaram a alergenicidade da proteína, reconhecida pelo IgE de soros de pacientes alérgicos ao veneno de vespas. A estrutura 3D revelou uma proteína com 28 % de α -hélices e 17,1 % de folhas- β , também com alta similaridade com o Ag 5 de himenópteros de elevada relevância clínica. Os dados obtidos com este trabalho fornecem as bases para a produção heteróloga da proteína e seu emprego em sistemas de diagnóstico de alergia ao veneno de *A. pallens* no Brasil.

Palavras-chave: Antígeno 5. Alergia. Hymenoptera. Proteômica.

ABSTRACT

Antigen 5 (Ag 5) is a protein commonly found in the venom of social wasps. Although its biological function is unknown, it has a high clinical relevance, since it's one major elicitors of hypersensitivity reactions in sensitized patients. The reliable diagnostic and immunotherapy of venom allergy often requires the use of purified allergens to identify the species responsible for the primary sensitization. The rational design of panels of individuals components requires previous extensive molecular characterization of the venom allergens. In Brazil, however, there's a lack of data concerning the allergenic arsenal on venom of most native wasps. In this work we used proteomic and bioinformatic approaches to identify and characterize the venom Ag 5 (Apo p 5) of the social neotropical wasp *Apoica pallens*. The protein was identified by SDS-PAGE and purified by cation exchange liquid chromatography, followed by *in gel* and in solution digestion with proteolytic enzymes. The peptides generated were identified by MALDI-ToF and ESI-QToF mass spectrometry and compared to an Ag 5 reference sequence in order to obtain the complete primary structure of Apo p 5. *In silico* tools allowed the molecular modelling of the 3D structure of the protein and the prediction of post-translational modifications. Immunoblot assays confirmed the allergenicity of the protein, recognized by IgE from sera of patients allergic to wasp's venom. As a result, we acquired a protein with 207 amino acid residues, theoretical mass of 23 kDa and high identity with Ag 5 of species within the subfamily Polistinae. The 3D structure revealed a protein with 28 % of α -helices and 17,9 % of β -sheets, also highly similar to the described structure of the venom Ag 5 from other taxonomically related clinically relevant hymenopterans. The data obtained here provides the basis for the heterologous production of Apo p 5 and further use employment in routine diagnosis of *A. pallens*-caused allergy in Brazil.

Keywords: Antigen 5. Allergy. Hymenoptera. Proteomics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Relevância clínica dos Hymenoptera	7
1.2 Fisiopatologia de venenos de Hymenoptera	8
1.3 Composição química dos venenos	10
1.4 Antígeno 5.....	11
1.5 Diagnóstico de alergia e imunoterapia	13
1.6 <i>Apoica pallens</i>	15
1.7 Justificativa do trabalho.....	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Material biológico	18
3.2 SDS-PAGE.....	18
3.3 Purificação do Apo p 5	18
3.4 Digestão <i>in gel</i>	19
3.5 Digestão por <i>shotgun</i>	20
3.6 Espectrometria de massas.....	20
3.7 Identificação do Apo p 5 e montagem da sequência.....	21
3.8 Predição de modificações pós-traducionais e epítomos lineares.....	22
3.9 Modelagem molecular	22
3.10 <i>Immunoblotting</i>	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Localização e purificação da proteína.....	23
4.2 Identificação do Ag 5.....	24

4.3 <i>Immunoblotting</i>	25
4.4 Montagem da sequência do Apo p 5.....	26
4.5 Predição de modificações pós-traducionais e epítomos lineares.....	34
4.6 Estrutura tridimensional do Apo p 5	38
5 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância clínica dos Hymenoptera

Hymenoptera é uma ordem extremamente diversa de insetos, compreendendo em torno de 153.000 espécies descritas. Esta ordem abrange diferentes grupos de elevada relevância clínica, incluindo abelhas (Apidae), vespas (Vespidae) e formigas (Myrmicidae). Hymenoptera é a terceira maior ordem da classe Insecta, atrás apenas de Coleoptera e Lepidoptera (PETERS et al., 2017; SHARKEY, 2007). Estimativas do número total de himenópteros existentes variam entre 600.000 e 2,5 milhões. Seu sucesso evolutivo se deve principalmente à grande variedade de nichos ecológicos dentro do grupo, uma vez que ocupam muitos tipos de ambientes e assumem uma vasta gama de hábitos alimentares, podendo ser fitófagos, parasitários ou predadores (KLOPFSTEIN et al., 2013).

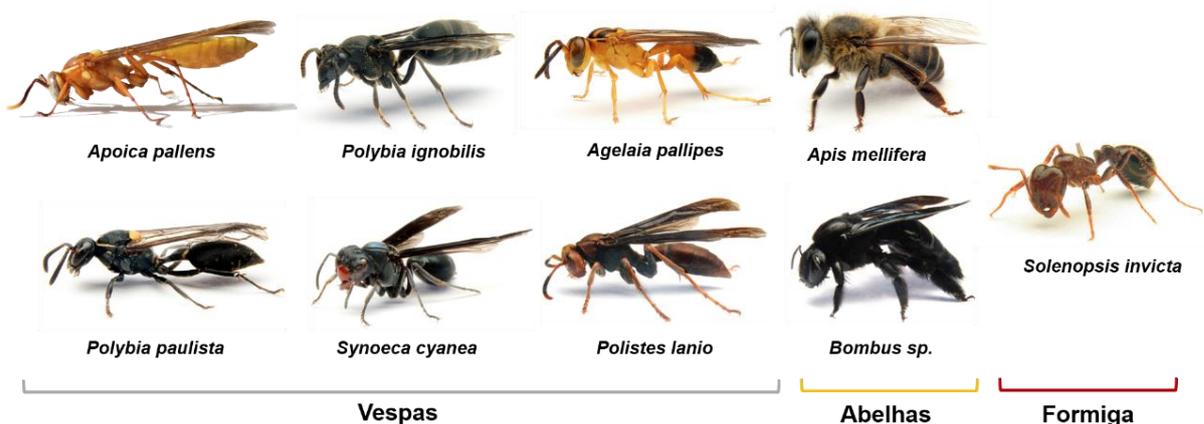
Membros de Hymenoptera caracterizam-se também pelo desenvolvimento de diversos tipos de socialidade (KLOPFSTEIN et al., 2013; QUIÑONES; PEN, 2017). Himenópteros sociais em particular (abelhas, vespas, formigas) estão envolvidos num elevado número de acidentes por ferroada a cada ano e constituem um importante problema de saúde pública. Isso é especialmente relevante nas regiões neotropicais, devido à grande diversidade de espécies identificadas e à coexistência com populações humanas (JUSTO-JACOMINI et al., 2014). Himenópteros sociais ferroam para capturar presas e/ou para defender suas colônias do ataque de predadores maiores, tipicamente vertebrados. Desta forma, seu veneno é formado principalmente por moléculas tóxicas e alergênicas, que maximizam o potencial de defesa do inseto ao induzir o maior incômodo possível ao animal (LEE; BAEK; YOON, 2016).

Aproximadamente 0,2 % das espécies de Hymenoptera pode ferroar humanos (SCHMIDT, 2018). De acordo com estudos epidemiológicos, a população adulta que já foi ferroadada por himenópteros ao menos uma vez varia entre 56,6–94,5 % (BILÒ; BONIFAZI, 2009). A prevalência de reações sistêmicas a ferroadas de himenópteros é estimada entre 0,3–8,9 %, com anafilaxia em 0,3–42,8 % das ocorrências. O veneno de Hymenoptera causa 27% dos casos de anafilaxia e 20% das mortes associadas a reações anafiláticas (BILÒ, 2011; BILÒ; BONIFAZI, 2009; OROPEZA et al., 2017). Características da região geográfica e desenvolvimento socioeconômico influenciam

na relevância clínica de ferroadas de himenópteros dentro de determinada localidade (PEREZ-RIVEROL et al., 2015).

Na América Latina, ferroadas de insetos são a terceira maior causa de reações anafiláticas (14,9 %), atrás apenas de fármacos (31,2 %) e alimentos (23,3 %) (SOLE et al., 2011). O Brasil, em particular, abriga uma grande diversidade de himenópteros sociais de relevância clínica (GUIMARÃES, 2008) (Figura 1). No caso de vespas, já foram identificadas no país aproximadamente 320 espécies, o que corresponde a 57 e 33 % do total encontrado na América Latina e no mundo, respectivamente (LOCHER et al., 2014). Muitas delas possuem comportamento agressivo. Além disso, colônias de vespas sociais comumente se estabelecem nos arredores de núcleos urbanos, o que contribui para a ocorrência de um elevado número de acidentes (PEREZ-RIVEROL et al., 2017).

Figura 1 - Himenópteros brasileiros de elevada importância clínica.



Fonte: Professor M. S. Palma.

1.2 Fisiopatologia de venenos de Hymenoptera

A severidade dos sintomas causados pelo veneno de Hymenoptera depende de vários fatores, incluindo a quantidade de veneno injetado, exposição prévia, idade da vítima, espécie do inseto e acometimento por doenças crônicas (BILÒ, 2011). Em indivíduos não alérgicos as patologias experimentadas estão relacionadas aos efeitos tóxicos diretos dos componentes do veneno e dependem fundamentalmente da quantidade injetada no organismo (SCHMIDT, 2018). Em abelhas, por exemplo, casos de envenenamentos moderados (até 200 ferroadas) resultam em dor abdominal,

diarreia, vômitos, taquicardia, hipertensão e falha renal. Casos severos (200-500 ferroadas) envolvem falência múltipla de órgãos, hemólise, rabdomiólise, danos hepáticos e congestão pulmonar. Por fim, casos potencialmente fatais (mais de 500 ferroadas) ocasionam falhas severas dos órgãos, trombocitopenia e infarto, assim como rabdomiólise e hemólise severos e coagulação generalizada (PEREZ-RIVEROL et al., 2019; VETTER, 2018).

Em indivíduos alérgicos, uma única ferroadada – até 170 µg de veneno no caso de *Polistes* – é suficiente para desencadear reações de hipersensibilidade, incluindo anafilaxia com perigo para a vida (OZDEMIR et al., 2011; SCHMIDT, 2018). No processo de sensibilização, células apresentadoras de antígeno (APCs) localizadas na pele processam o alérgeno e permitem o reconhecimento dos epítopos por linfócitos B e T (OZDEMIR et al., 2011). Linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em células Th2, que produzem citocinas (IL-4 e IL-13) responsáveis por induzir a produção de IgE por linfócitos B. O IgE se liga a receptores FcεRI na superfície de mastócitos e basófilos. A formação do complexo antígeno-IgE-FcεRI induz a degranulação dos mastócitos e basófilos e a liberação de mediadores inflamatórios, especialmente histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outras citocinas. As manifestações subsequentes podem ser localizadas ou generalizadas (LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006).

Reações alérgicas localizadas são reações dependentes de IgE, manifestando-se entre 12 e 48 h após a ferroadada. Consistem em processos inflamatórios locais prolongados que envolvem principalmente inchaço e coceira. Possuem baixa gravidade, a não ser que a ferroadada ocorra na região da faringe (GOLDEN, 2005, 2007). Reações sistêmicas mediadas por IgE já se dão em questão de minutos ou poucas horas após a exposição ao alérgeno (SIMONS et al., 2014). Tipicamente se manifestam por dermatoses e edemas e são mais graves quando envolvem outros sistemas (GOLDEN, 2005). Desordens gastrointestinais se dão com náuseas, vômitos e incontinência fecal. Broncoconstrição pode ocorrer junto com desregulações do sistema cardiovascular, culminando em paradas cardiorrespiratórias. Outros efeitos são diaforese, perda de consciência e incontinência urinária (JAKOB et al., 2017a). Desfechos fatais podem decorrer, embora sejam raros em números absolutos, contabilizados em 0,03-0,48 por milhão de vítimas anualmente (BILÒ; BONIFAZI, 2009). Até o momento, o único tratamento específico e curativo contra a alergia ao

veneno de Hymenoptera é a imunoterapia com componentes do veneno (OLLERT; BLANK, 2015).

1.3 Composição química dos venenos

A utilização de técnicas bioquímicas clássicas aliadas a métodos de proteômica mais recentes de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tem permitido elucidar de forma cada vez mais detalhada a composição química do veneno de himenópteros (MATYSIAK et al., 2014). O veneno é utilizado por esses insetos na defesa do indivíduo ou da colônia contra predadores e na captura de presas (no caso de espécies predadoras) (PALMA, 2013). Consiste numa complexa mistura de moléculas orgânicas de baixa massa molecular (terpenos e aminas biogênicas), peptídeos lineares policatiônicos e proteínas, incluindo vários alérgenos (OLLERT; BLANK, 2015). Compostos orgânicos de baixa massa molecular possuem funções diversas, com destaque para processos inflamatórios (PALMA, 2013). Peptídeos em especial induzem lise celular, hemólise, degranulação de mastócitos, quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares e contração da musculatura lisa (SOUZA; PALMA, 2009). Peptídeos são os componentes mais abundantes, chegando a 70 % do peso seco do veneno (DIAS et al., 2014; MÜLLER, 2011). Proteínas, algumas com atividade enzimática, estão envolvidas em efeitos tóxicos diretos, como dano tecidual, e, no caso do alérgenos, na indução de reações de hipersensibilidade e anafilaxia (SANTOS-PINTO et al., 2018).

A grande maioria dos casos fatais associados a acidente com Hymenoptera é causada por indução de reações de hipersensibilidade pelas proteínas alergênicas presentes no veneno. Os alérgenos mais relevantes identificados no veneno de abelhas são fosfolipase A2 (PLA2), fosfatases ácidas, hialuronidase, dipeptidil peptidase IV (DPPIV), icarapina (BLANK et al., 2011) e o peptídeo melitina (VAERENBERGH et al., 2014). Em vespas, destacam-se fosfolipase A1 (PLA1), hialuronidase, DPPIV e antígeno 5 (SPILLNER; BLANK; JAKOB, 2014). No caso de formigas, fosfolipases A1 e antígeno 5 são os principais alérgenos caracterizados (SANTOS-PINTO et al., 2018).

A sequência primária e a estrutura tridimensional das PLA1s (vespa, formiga) não mostram níveis de identidade significativos com as PLA2s (abelhas) (PEREZ-RIVEROL et al., 2019). Durante o envenenamento, PLA1 e PLA2 atuam hidrolisando

os glicerofosfolipídeos de membranas biológicas nas posições *sn-1* e *sn-2*, respectivamente. O consequente rompimento das células leva a quadros como hemólise e disfunção de miocárdio (HOU et al., 2016).

A hialuronidase possui importante papel como fator de difusão, clivando o ácido hialurônico da matriz extracelular e desagregando as células para facilitar a penetração de outros componentes do veneno através dos tecidos (SANTOS-PINTO et al., 2012). A DPPIV cliva dipeptídeos da extremidade N-terminal de peptídeos específicos que tenham resíduos de alanina ou prolina na penúltima posição (HSIEH et al., 2011). O papel específico da DPPIV e do Ag 5 no envenenamento por insetos é desconhecido (SANTOS-PINTO et al., 2018). Ainda assim, a abundância de Ag 5 no veneno (5-10% do peso seco) e a alta prevalência de sensibilização ao alérgeno, combinado à ausência de alérgenos homólogos no veneno de abelhas, tornam o antígeno 5 um marcador para alergia ao veneno de vespas e formigas (JAKOB et al., 2017a). Até o momento, 76 alérgenos de 31 espécies de himenópteros já foram descritos e oficialmente reconhecidos como alérgenos (www.allergen.org) (JAKOB et al., 2017b).

1.4 Antígeno 5

O antígeno 5 (Ag 5) é uma proteína pertencente à superfamília CAP, um grupo de proteínas secretadas ricas em resíduos de cisteína, com funções endócrinas ou parácrinas relacionadas a morfogênese celular, regulação do sistema imune, modulação da matriz extracelular, entre outras (GIBBS; ROELANTS; O'BRYAN, 2008). É uma das proteínas predominantes no veneno de vespas, representando 5-10 % do peso seco (JAKOB et al., 2017b). O Ag 5 tem sido identificado em espécies da maioria de gêneros de vespas sociais (*Polistes*, *Poybia*, *Vespa*, *Dolichovespula*, *Vespula*) e em formigas (*Solenopsis*, *Pachycondyla*) clinicamente relevantes.

Um elevado número (>20) de antígenos 5 já foram incluídos na lista oficial de alérgenos de Hymenoptera (www.allergen.org) (SANTOS-PINTO et al., 2014, 2018) (Tabela 1). Cristalografia de raio X foi utilizada para a caracterização estrutural do Ag 5 de *V. vulgaris*(Ves v 5) (PDB ID: 1QNX), revelando uma estrutura em padrão α - β - α composta por cinco hélices- α e quatro dobras- β (HENRIKSEN et al., 2001). No caso de formigas, a descrição do Ag 5 ocorreu apenas para *S. invicta* (Sol i 3) e *P. chilensis* (Pac p 3), que apresentaram 44 % e 50 % de identidade com Ves v 5, respectivamente

(LEE et al., 2009; PADAVATTAN et al., 2008). O estudo por cristalografia de Sol i 3 (PDB ID: 2VNZ) mostrou que o alérgeno possui um padrão α - β - α assim como Ves v 5, mas há diferenças na estrutura dos loops (PADAVATTAN et al., 2008) (Figura 2). A identidade de Sol i 3 com o Ag 5 de vespas sociais varia entre 45 e 51 %. Entre vespas pertencentes à mesma subfamília (Vespinae para *Vespula*, *Vespa* e *Dolichovespula* e Polistinae para *Polybia* e *Polistes*), a identidade varia entre 64 e 85 %. Para subfamílias diferentes, a identidade cai para 45-63 % (SCHIENER et al., 2017).

A prevalência de IgEs específicos para o Ag 5 é de 84,5-90 % dos casos de sensibilização por vespas (PEREZ-RIVEROL et al., 2019). Dada a sua importância, sistemas de expressão heteróloga têm sido empregados para a produção da proteína em sua forma recombinante. O uso de Ves v 5 para o diagnóstico de alergia a veneno de vespas permitiu um incremento de 83 % para 97 % na sensibilidade do teste. Uma vez que não há sítios de N-glicosilação, o Ag 5 é desprovido de CCDs (seção 1.5), diminuindo a incidência de reatividade cruzada (JAKOB et al., 2017b).

Tabela 1 – Principais espécies cujo antígeno 5 já foi identificado e caracterizado.

Espécie	Identificação	Disponibilidade para diagnóstico
<i>Vespula vulgaris</i>	Ves v 5	rVes v 5
<i>Vespula germânica</i>	Ves g 5	–
<i>Vespa cabro</i>	Ves c 5	–
<i>Dolichovespula maculata</i>	Dol m 5	–
<i>Polistes dominula</i>	Pol d 5	rPol d 5
<i>Polistes annularis</i>	Pol a 5	–
<i>Polybia paulista</i>	Poly p 5	–
<i>Polybia scutellaris</i>	Poly s 5	–

Fonte: modificado de JAKOB, 2017a.

Até o momento, apenas o antígeno 5 de *P. paulista* (Poly p 5) já foi identificado em vespas neotropicais. Análises por espectrometria de massas revelaram que Poly p 5 nativo é uma proteína com 22,994 kDa e 207 aminoácidos. Há oito resíduos de cisteína formando quatro pontes dissulfeto para estabilizar a estrutura, composta por 28 % de hélices- α e 17,9 % de folhas- β . A identidade com o antígeno 5 de outras espécies varia entre 59,3 e 93,7 % (SANTOS-PINTO et al., 2014). Através do mapeamento dos epítomos lineares de Poly p 5 foram identificados nove epítomos,

sendo um deles (epítipo 7) reconhecido por IgG e por IgE. Análises *in silico* revelaram as posições desses epítipos, estando o epítipo 7 num *loop* na superfície do antígeno 5, posição que facilita sua interação com anticorpos (SANTOS-PINTO et al., 2015).

Figura 2 – Modelos tridimensionais do antígeno 5 de *V. vulgaris* (A), *P. paulista* (B) e *S. invicta* (C).



Fonte: adaptado de HENRIKSEN, 2001 (A); SANTOS-PINTO, 2014 (B); PADAVATTAN, 2008 (C).

O antígeno 5 de seis espécies de vespas sociais do Hemisfério Norte já foi clonado e expresso em células de *Spodoptera frugiperda*, visando sua aplicação em testes diagnósticos (SCHIENER et al., 2017). Células de bactéria e levedura também são comumente empregadas para essa finalidade (MONSALVE; LU; KING, 1999). Recentemente, o Ag 5 de *P. paulista* foi clonado em células de *Pichia pastoris*. A proteína rPoly p 5, obtida na forma solúvel, possui o mesmo nível de reconhecimento por IgEs do soro de pacientes alérgicos de sua versão natural, comprovando a aplicabilidade de *P. pastoris* na produção heteróloga de Ag 5 para sua aplicação clínica (BAZON et al., 2017).

1.5 Diagnóstico de alergia e imunoterapia

O diagnóstico de alergia envolve fatores como histórico de ocorrência de reações sistêmicas, testes dérmicos positivos e, particularmente, avaliação da presença de anticorpos IgE específicos a proteínas do veneno (OLLERT; BLANK, 2015). A correta identificação do inseto responsável pela ferroada é de vital importância para a adoção da melhor estratégia imunoterapêutica, uma vez que o tratamento com veneno de outras espécies pode gerar efeitos colaterais e sensibilizações *de novo* (BLANK; BILÒ; OLLERT, 2018; PEREZ-RIVEROL et al., 2017). O diagnóstico molecular baseado na uso de alérgenos individuais tem se mostrado como uma ótima estratégia na identificação do veneno causador da

sensibilização primária (JAKOB et al., 2017b). No Brasil, não existem componentes individuais disponíveis para o diagnóstico molecular de alergia. Consequentemente, são utilizados apenas extratos de veneno bruto e alérgenos purificados de espécies do Hemisfério Norte, o que está associado a baixa sensibilidade e ocorrência de reatividade cruzada (PEREZ-RIVEROL et al., 2017).

Reações cruzadas ocorrem pela existência de epítopos proteicos semelhantes e/ou de carboidratos determinantes de reatividade cruzada (CCDs, do inglês *Cross-Reactive Carbohydrates Determinants*) ligados a N-glicanos (BREHLER; GRUNDMANN; STÖCKER, 2013). Os CCDs são reconhecidos por IgEs irrelevantes, levando à identificação errada da espécie responsável pela sensibilização primária e posteriormente à inclusão de múltiplos venenos na imunoterapia (OLLERT; BLANK, 2015). Até 75 % dos casos de duplo-positivos para alergia a veneno de vespas e abelhas ocorrem pelo reconhecimento de CCDs (SEISMANN et al., 2010). A utilização de alérgenos não glicosilados – como é o caso do antígeno 5 – é uma estratégia para diminuir a incidência de reatividade cruzada baseada em CCDs, permitindo uma melhor discriminação entre espécies (PEREZ-RIVEROL et al., 2018).

A ausência tanto de CCDs quanto de homólogos estruturais do Ag 5 no veneno de abelhas e a elevada prevalência de IgE específico a esse alérgeno no soro de pacientes alérgicos tornam a proteína promissora no diagnóstico específico de alergia ao veneno de himenópteros, especialmente na discriminação de alergia do veneno de abelhas em relação a vespas e formigas (CARUSO et al., 2016; JAKOB et al., 2017a). Além disso, o Ag 5 é uma proteína extremamente abundante no veneno e sua produção na forma heteróloga já é consolidada em diversos sistemas de expressão (BAZON et al., 2017). Atualmente, rPol d 5 e rVes v 5 já são usados de forma recorrente para testes diagnósticos (JAKOB et al., 2017a).

A imunoterapia com veneno é uma alternativa especialmente recomendada para o tratamento de pessoas acometidas por reações sistêmicas após ferroadas (BONIFAZI et al., 2005). O procedimento funciona através da administração dos alérgenos purificados naturais ou recombinantes em concentrações e intervalos determinados (GOLDEN, 2005). A tolerância aos alérgenos é induzida com a produção de linfócitos T regulatórios específicos para o antígeno, que suprimem a atividade de células efetoras do sistema imune, como mastócitos, basófilos e eosinófilos. Linfócitos T regulatórios também podem regular a produção de IgE por

linfócitos B (OZDEMIR et al., 2011). A eficiência da imunoterapia na prevenção contra novos casos de anafilaxia gira entre 75 e 98 % (GOLDEN, 2007).

1.6 *Apoica pallens*

Apoica pallens (Hymenoptera, Vespidae) é uma vespa social neotropical de ampla distribuição, ocorrendo desde o México até a Argentina (PICKET, 2003). É comumente encontrada em áreas rurais do sudeste do Brasil, onde está associada a muitos acidentes por ferroadas. Dentro da família Vespidae, *A. pallens* está incluída na subfamília Polistinae e tribo Epiponini, da qual também fazem parte gêneros de vespas clinicamente relevantes como *Polybia* e *Agelaia* (ARÉVALO et al., 2004; CARPENTER, 1991) (Figura 1).

Vespas da espécie *A. pallens* são peculiares por possuírem comportamento forrageador primariamente noturno, provável adaptação à competição com outras vespas tipicamente diurnas. Também se juntam em enxames com centenas de indivíduos para migrar para outros locais de nidificação. Os ninhos de *A. pallens* possuem arquitetura característica, com os alvéolos expostos. Larvas e ovos dependem de proteção direta dos adultos, que ocupam as superfícies dos favos durante o dia (HUNT; JEANNE; KEEPING, 1995). Apesar da sua relevância clínica, trabalhos abordando a composição molecular do veneno desta espécie são escassos. Até o momento não foram identificadas proteínas do seu veneno com atividade alergênica que possam ser usadas no desenvolvimento de sistemas de diagnóstico específico de alergia.

1.7 Justificativa do trabalho

No Brasil, apesar da grande diversidade de himenóptero, há uma carência de dados sobre a composição específica do veneno das espécies brasileiras, mesmo das clinicamente mais relevantes. A única espécie encontrada no país contemplada em trabalhos de caracterização molecular e alergômica é *P. paulista* (SANTOS-PINTO et al., 2014). Infelizmente, informações acerca das características apenas desta vespa não são suficientes para arcar com todas as ocorrências médicas relacionadas a ferroadas de vespídeos neotropicais. A dependência por alérgenos de espécies do Hemisfério Norte ou o uso de extratos brutos prejudica o diagnóstico e a identificação

da vespa responsável pela sensibilização primária. Com isso, as estratégias de imunoterapia escolhidas apresentam pouco efeito ou agravam os quadros clínicos por gerarem efeitos colaterais.

A identificação do antígeno 5 de *A. pallens* (Apo p 5) seria um primeiro passo para a completa caracterização dos alérgenos no veneno desta espécie. Dados gerados com o sequenciamento da proteína serviriam como base para a clonagem do Apo p 5 em vetores de expressão heteróloga e sua produção na forma recombinante. Deste modo, viabilizar-se-ia o emprego do alérgeno para o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico molecular específicos para casos de alergia ao veneno desta espécie e, futuramente, imunoterapia. Paralelamente, seria possível a realização de estudos comparativos entre as proteínas de vespas de diversas espécies, tornando a proteína, junto com outras macromoléculas chave, uma ferramenta de análise filogenética. A caracterização individual dos componentes do veneno também é vital para a compreensão do processo de envenenamento. Tendo esses aspectos em consideração, este estudo se propôs a identificar, sequenciar e caracterizar estrutural e imunologicamente o Apo p 5 por meio de abordagem proteômica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar, purificar e caracterizar o antígeno 5 (Apo p 5) do veneno da vespa neotropical *Apoica pallens* (Hymenoptera, Vespidae) mediante métodos de proteômica e ensaios de *immunoblot*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Obter o veneno bruto de *A. pallens* em quantidade e qualidade satisfatórias para as análises;
- b) Confirmar a alergenicidade do Apo p 5 mediante análise de *immunoblot*, utilizando soro de pacientes alérgicos ao veneno de vespas;
- c) Purificar o Apo p 5 ao partir do veneno de *A. pallens* mediante cromatografia líquida de troca catiônica;
- d) Obter a sequência primária do Apo p 5 por espectrometria de massas e análise em bases de dados de biomoléculas de Hymenoptera;
- e) Realizar análises da estrutura primária e a modelagem estrutural *in silico* do Apo p 5 usando bases de dados de proteínas e ferramentas bioinformáticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Ninhos de *A. pallens* foram coletados dentro do campus da UNESP de Rio Claro e na região rural do município. As glândulas de veneno foram obtidas mediante extração manual utilizando pinças estéreis em gelo. A preparação dos extratos foi realizada de acordo com um método já descrito (SANTOS et al., 2007). Brevemente, as glândulas extraídas foram suspendidas e maceradas numa solução contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM e EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail Tablets 0,2 % v/v (Sigma) para evitar a degradação das toxinas proteicas. Após centrifugação, coletou-se o sobrenadante e quantificou-se o conteúdo de proteínas utilizando o kit Qubit® Protein Assay (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Os extratos foram então separados em alíquotas, secados em *SpeedVac* e mantidos refrigerados a -80 °C até o momento do uso.

Soros de pacientes sensibilizados ao veneno de vespas (n=10) obtidos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP) foram utilizados nos ensaios de imunológicos, sob licença aprovada pelo Comitê de Ética da FCM-UNICAMP (nº 2.459.270). Soros de pacientes não sensibilizados foram utilizados como controle negativo.

3.2 SDS-PAGE

Os extratos brutos (20µg) de veneno liofilizados foram ressolubilizados em água deionizada e submetidos a separação por eletroforese unidimensional SDS-PAGE (15%) (LAEMMLI, 1970) utilizando um sistema MiniVE (GE Healthcare). Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250, escaneado com o ImageMaster System (GE Healthcare) e preservados em solução de ácido acético 5 %.

3.3 Purificação do Apo p 5

Para a purificação do Apo p 5, o extrato bruto de veneno foi submetido a cromatografia de troca catiônica, segundo protocolo descrito anteriormente no nosso laboratório para outros alérgenos de vespas neotropicais (SANTOS et al., 2007), com

modificações. 25 mg de veneno foram solubilizados em tampão de acetato de sódio 50 mM e pH 5,2. Foi utilizada uma coluna HiPrep FF CM 16/10 (GE Healthcare) de 20 mL, equilibrada com a mesma solução e acoplada a um sistema ÄKTA-FPLC. Foram coletadas frações de 2 mL a um fluxo de 2 mL/min, estabelecendo-se um gradiente crescente de cloreto de sódio até a concentração máxima de 1 M no mesmo tampão. Dados cromatográficos foram adquiridos e tratados com o software UNICORN. As frações foram analisadas por SDS-PAGE, sendo que aquelas que continham uma banda correspondente à massa molecular do Ag 5 (~23 kDa) foram quantificadas, alíquotadas, secadas e armazenadas a -80 °C.

3.4 Digestão *in gel*

Para confirmar a purificação do Ag 5 do veneno bruto, fragmentos da banda correspondente à massa molecular esperada para o Apo p 5 (~23 kDa) foram processados seguindo o método adaptado de SANTOS-PINTO et al., 2012. Brevemente, pequenos pedaços (“*spots*”) foram cortados manualmente da banda do Ag 5 e descorados com solução de acetonitrila 50 %/bicarbonato de amônio 25 mM. Redução e alquilação das pontes dissulfeto foram feitos com soluções de ditioneitol 10 mM (DTT) e iodoacetamida 55 mM (IAA), respectivamente, seguido da incubação individual com as seguintes enzimas: tripsina (Promega) em bicarbonato de amônio 25 mM por 16 h a 37 °C; quimiotripsina (Roche Diagnostics) em bicarbonato de amônio 25 mM por 16 h a 30 °C; endoproteínase GluC (Sigma) em bicarbonato de amônio 25 mM por 16h a 37 °C; proteinase K (Sigma) em bicarbonato de amônio 25 mM por 2 h a 37 °C; e pepsina (Sigma) em HCl 0,1 M por 4 h a 37 °C. A concentração final das enzimas foi de 40 ng/μL.

Os peptídeos resultantes foram extraídos dos *spots* com solução de acetonitrila 50 %/ácido fórmico 5 %, secados em *SpeedVac* e submetidos a dessalinização e limpeza com PerfectPure C18 Pipet Tips (Eppendorf), seguindo instruções do fabricante. Após nova secagem, foram armazenados a -20 °C até a análise por MALDI-ToF-ToF.

3.5 Digestão por *shotgun*

Para o sequenciamento do Apo p 5, submeteu-se frações de 150 µg do alérgeno purificado a digestão em solução (*shotgun*) (SANTOS-PINTO et al., 2016). Iniciou-se com desnaturação das proteínas por solubilização em solução de bicarbonato de amônio 50 mM/ureia 7,5 M. Redução e alquilação foram feitos com a incubação em soluções de DTT 0,1 M e IAA 0,4 M. Seguiu-se com a adição de CaCl₂ 1 M e, na sequência, de soluções das enzimas tripsina, quimiotripsina, proteinase K e pepsina, individualmente, incubadas nas mesmas condições descritas na seção 3.4. As reações foram interrompidas com ácido fórmico. Para cada enzima, uma coluna Strata C18-E (Phenomenex) foi equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % em acetonitrila (ACN). Passou-se pelas colunas as soluções com os peptídeos, que foram recuperados dos filtros com solução de ACN 80 %/TFA 0,1 % (v/v). As soluções finais foram secadas, ressolubilizadas em ACN 50 % para quantificação, secadas novamente e armazenadas a -20 °C para análise por ESI-QToF.

3.6 Espectrometria de massas

Peptídeos produzidos por digestão *in gel* foram solubilizados em solução ACN 30 % misturada em proporção 1:1 com a matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), preparada em solução ACN 50 %/TFA 0,1 % (v/v). Para a análise foi usado um MALDI-ToF-ToF Ultraflexxtreme (Bruker Daltonics), calibrado com uma solução Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics), com fonte de ionização por MALDI (*Matriz Assisted Laser Desorption Ionization*) e analisadores de massa *time-of-flight in tandem*. Espectros de MS e MS/MS foram obtidos com 500 e 250 disparos de laser por espectro, respectivamente, numa frequência de 1000 Hz. Íons MS de interesse foram selecionados manualmente para fragmentação.

Os peptídeos gerados por digestão em solução, destinados para o sequenciamento, foram ressolubilizados em ACN 50 %/TFA 0,5 % (v/v) e injetados num espectrômetro do tipo µLC-ESI-microTOF-Q-III (Bruker Daltonics), calibrado com a solução Tune-Mix Electrospray Calibrant (Agilent) e acoplado a uma coluna C18 12 nm de HPLC (Shimadzu), com fonte de ionização *electrospray* e analisadores de massa do tipo *quadrupole e time-of-flight*. Utilizou-se um gradiente 5-95 % (v/v) de ACN com ácido fórmico (0,05 % v/v) para eluição dos peptídeos, num fluxo de

0,2 mL/min. O gás de colisão usado foi o hélio, sob pressão de 100 kPa, energia de colisão de 50 % e frequência de 30 kHz. Espectros MS/MS foram gerados e tratados com o DataAnalysis 4.1.

3.7 Identificação do Apo p 5 e montagem da sequência

Os dados gerados por espectrometria de massas foram analisados com o MASCOT Protein Search Engine v. 2.2, tendo como referência sequências de proteínas homólogas depositadas no National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) para a identificação dos peptídeos. Para cada enzima foi feita uma busca, na qual foram selecionados os seguintes parâmetros: banco de dados Hymenoptera, táxon *Other metazoa*, máximo de 3 clivagens perdidas, carga de +1 a +3 por íon, erro de tolerância de 0,5 Da para íons precursores (MS) e 0,8 para íons fragmentados (MS/MS), carbamidometilação (C) como modificação pós-traducional fixa e oxidação de metionina como modificação pós-traducional variável.

No caso da digestão em solução, foi também usado o PEAKS Studio 7 para a identificação dos peptídeos por busca em bancos de dados (selecionado para Hymenoptera) e sequenciamento *de novo*. Os parâmetros selecionados foram: fragmentação por CID (*Collision-Induced Ionization*), carga de +1 a +3 por íon, erro de tolerância de 0,3 Da para íons precursores e 0,1 Da para íons fragmentados, máximo de 3 clivagens perdidas e carbamidometilação (C) e oxidação da metionina como modificações pós-traducionais fixa e variável. Para peptídeos gerados por sequenciamento *de novo*, priorizou-se o uso de peptídeos com um ALC (*Average Local Confidence*) igual a ou maior que 50 %.

A montagem da estrutura primária do Apo p 5 foi feita manualmente até sua cobertura total. A localização de cada peptídeo dentro da proteína foi inferida com auxílio da ferramenta online MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (CORPET, 1988), tendo as sequências de Poly p 5 (UniProtKB/Swiss-Prot: E7D4M5) e Pol d 5 (UniProtKB/Swiss-Prot: P81656) como referência.

3.8 Predição de modificações pós-traducionais e epítomos lineares

A localização de possíveis sítios de N- e O-glicosilações foi feita por meio do algoritmo de predição avançada do GlycoEP (<http://crdd.osdd.net/raghava/glycoep/>), selecionando-se os parâmetros *Binary profile of patterns* e *Average Surface Accessibility* para N-glicosilações e *Composition profile of patterns* e *Average Surface Accessibility* para O-glicosilações. Nos dois casos os resultados foram combinados para ambos os parâmetros (CHAUHAN; RAO; RAGHAVA, 2013). Sítios de fosforilação em resíduos de serina, treonina e tirosina foram previstos com o NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), retornando resíduos com *score* acima de 0.5 (BLOM; GAMMELTOFT; BRUNAK, 1999). Epítomos lineares de linfócitos B foram previstos com o BcePred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) levando-se em conta quatro propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos: acessibilidade, exposição, polaridade e propensão antigênica. Valores de limite padrão foram utilizados para a seleção dos resíduos (SAHA; RAGHAVA, 2004).

3.9 Modelagem molecular

Com a sequência do Apo p 5 como *input* e a estrutura 3D do antígeno 5 de *Vesputula vulgaris* (PDB ID: 1QNX) como *template*, modelos tridimensionais da proteína foram gerados utilizando o MODELLER (WEBB; SALI, 2014). Os modelos foram submetidos a minimização de energia utilizando o software YASARA e validados com o MolProbity. A representação do modelo final em diagrama de fita foi gerada com o programa PyMol (PEREZ-RIVEROL et al., 2018).

3.10 Immunoblotting

A confirmação da alergenicidade da Apo p 5 foi feita seguindo-se um protocolo já descrito (PEREZ-RIVEROL et al., 2016), com modificações. Brevemente, as bandas obtidas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas e incubadas com um *pool* de soros (diluído em 1:50) de dez pacientes alérgicos ao veneno de Hymenoptera. A imunodeteção foi feita com anticorpos anti-IgE humano conjugados a peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluídos em 1:5000.

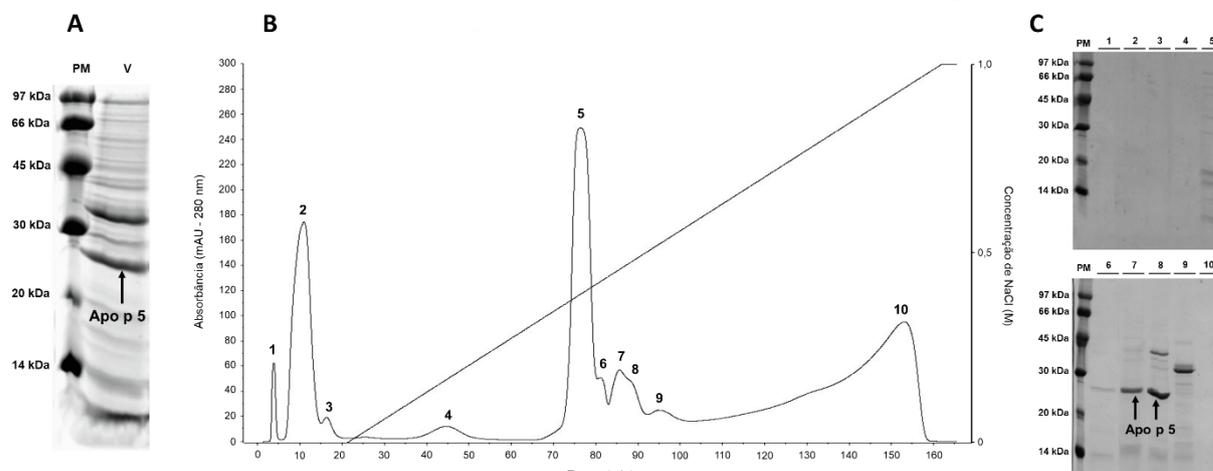
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Localização e purificação da proteína

A presença do Ag 5 de *A. pallens* foi inferida inicialmente por análise visual de géis de SDS-PAGE do veneno bruto. Baseando-se no trabalho de caracterização do antígeno 5 da vespa social *P. paulista* (SANTOS-PINTO et al., 2014), esperou-se encontrar uma banda majoritária a uma altura de próxima de 23 kDa típica do perfil proteico do veneno de vespas sociais de elevada importância clínica. Uma proteína proporcionalmente abundante e com peso molecular entre 20 e 30 kDa indicou a provável ocorrência do Ag 5 no veneno da espécie. (Figura 3A).

A separação dos componentes do veneno de *A. pallens* por cromatografia por troca catiônica gerou um cromatograma com dez picos de intensidade de sinal (enumerados de 1 a 10), mostrado na Figura 3B.

Figura 3 – SDS-PAGE (15 %) com o perfil proteômico do veneno bruto de *A. pallens* (A); cromatograma de troca catiônica (coluna HiPrep FF CM 16/10) de 25 mg de veneno (B) e SDS-PAGE (15 %) dos picos 1-10 do cromatograma (C).



PM: padrão molecular; V: veneno bruto.

Fonte: dados da pesquisa.

De início percebe-se um grande pico (2) flanqueado por dois menores (1 e 3) antes mesmo do gradiente de NaCl começar a se formar. Sendo revestida por grupos carboximetil, a matriz da coluna está carregada negativamente, de modo que fração significativa dos compostos eluídos nesses picos deve ser de moléculas com carga líquida negativa, prontamente repelidas pela matriz. O fato de não terem sido

detectadas por SDS-PAGE (Figura 3C) sugere que abriguem uma alta proporção de compostos de baixa massa molecular.

Após o início da formação do gradiente, pequenos picos se distribuem ao longo do cromatograma (4, 6, 7, 8, 9), junto com um maior (5) no meio do processo. Padrão semelhante foi verificado no cromatograma de *P. paulista* (JUSTO-JACOMINI et al., 2013). A partir dos 110 minutos, verifica-se uma ascendência constante na curva do cromatograma, que continua até aproximadamente os 154 minutos (pico 10), para então cair bruscamente. Supõe-se que as frações dessa região estão ricas em peptídeos e proteínas com alta carga líquida positiva, para os quais grande concentração de sal é necessária para que seja feita a eluição.

Uma banda majoritária pôde ser vista entre 20 e 30 kDa nos picos 6, 7 e 8. As frações com o melhor nível de purificação estavam concentradas no pico 7, nas quais detectou-se um nível de purificação maior que 90 %. Estas foram as escolhidas para serem usadas nos ensaios enzimáticos e imunológicos do trabalho.

Uma cromatografia líquida em dois estágios, envolvendo um procedimento de exclusão molecular, havia sido inicialmente cogitada para garantir a melhor purificação possível do Apo p 5. No entanto, feita a troca catiônica, várias frações (concentradas especialmente nos picos 7 e 8) apresentaram um nível de purificação da proteína que julgou-se ser bom o suficiente para a condução do trabalho. Somado à intenção de se evitar ao máximo a perda de material, a exclusão molecular acabou por ser descartada.

4.2 Identificação do Ag 5

A confirmação do Ag 5 veio com a identificação em bancos de dados (MASCOT) de peptídeos pertencentes ao Ag 5 de espécies dos gêneros *Polybia* e *Polistes*. Um código de acesso foi gerado para cada busca no BLAST Protein (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) (Tabela 2). Apenas para a pepsina não houve retorno de resultado.

Tabela 2 – Sequências peptídicas identificadas em banco de dados pelo algoritmo MASCOT, obtidas por digestão enzimática *in gel* do Apo p 5.

Enzima	Sequência	m/z observado (z)	Ion Score	Acesso
Tripsina	K.LIVNEHNR.F	994.5968(+1)	29	P35780.1
Quimiotripsina	L.IVNEHNR.F.R	1028.5630(+1)	44	P35780.1
	L.ETRGNPGPQPAASDMNNLVW.N	2154.1101(+1)	34	P35780.1
Endoproteinase GluC	L.ETRGNPGPQPAASDMNNLVWNDELAY.I	2859.4191(+1)	109	D4P2YA.1
	E.HNRFRQKVAQGLE.T	1582.9834(+1)	15	D4P2YA.1
Proteinase K	E.TRGNPGPQPAASDMNNLVWNDE.L	2383.2044(+1)	62	D4P2YA.1
	T.EEEKKLIVDEHNRFRQK.V	2198.2333(+1)	24	Q7Z156.2

m/z: relação massa/carga; z: carga do íon.

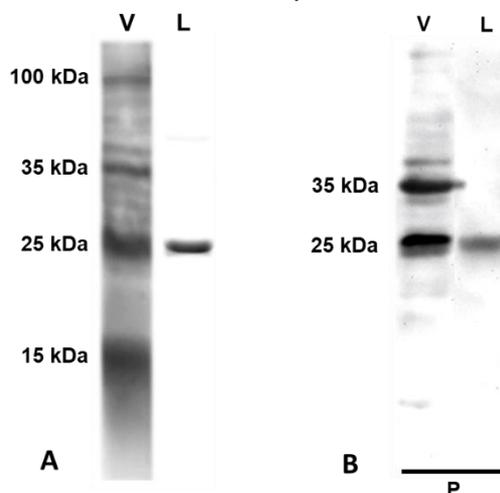
Fonte: dados de pesquisa.

Uma vez confirmado que a banda selecionada se tratava de um antígeno 5, pôde-se dar continuidade com os ensaios enzimáticos para gerar os peptídeos a serem utilizados para o sequenciamento.

4.3 Immunoblotting

O veneno bruto de *A. pallens* e o Apo p 5 purificado foram incubados com um *pool* de soros de pacientes (n = 10) alérgicos ao veneno de vespas (Figura 4).

Figura 4 – SDS-PAGE (12 %) (A) e *immunoblot* (B) do veneno bruto de *A. pallens* (V) e do Apo p 5 purificado (L). P: *pool* de soros (n = 10) de pacientes alérgicos ao veneno de vespa.



Fonte: dados de pesquisa.

O *immunoblot* mostra que o Apo p 5 é reativo ao IgE em um *pool* (n=10) de soros de pacientes alérgicos. Fica evidente o caráter potencialmente alergênico do Apo p 5, comprovando a importância de se realizar sua caracterização molecular para emprego no diagnóstico específico de alergia. Sua aplicação poderia se dar na diferenciação da sensibilização por abelhas, uma vez que estas últimas não possuem em seu veneno homólogos estruturais de Ag 5.

4.4 Montagem da sequência do Apo p 5

Peptídeos gerados pela digestão por *shotgun* de frações do pico 7 foram identificados em bases de dados pelos softwares MASCOT e PEAKS. Os dados são mostrados nas Tabelas 3 e 4. Espectros correspondentes a alguns peptídeos são mostrados nas Figuras 5 e 6.

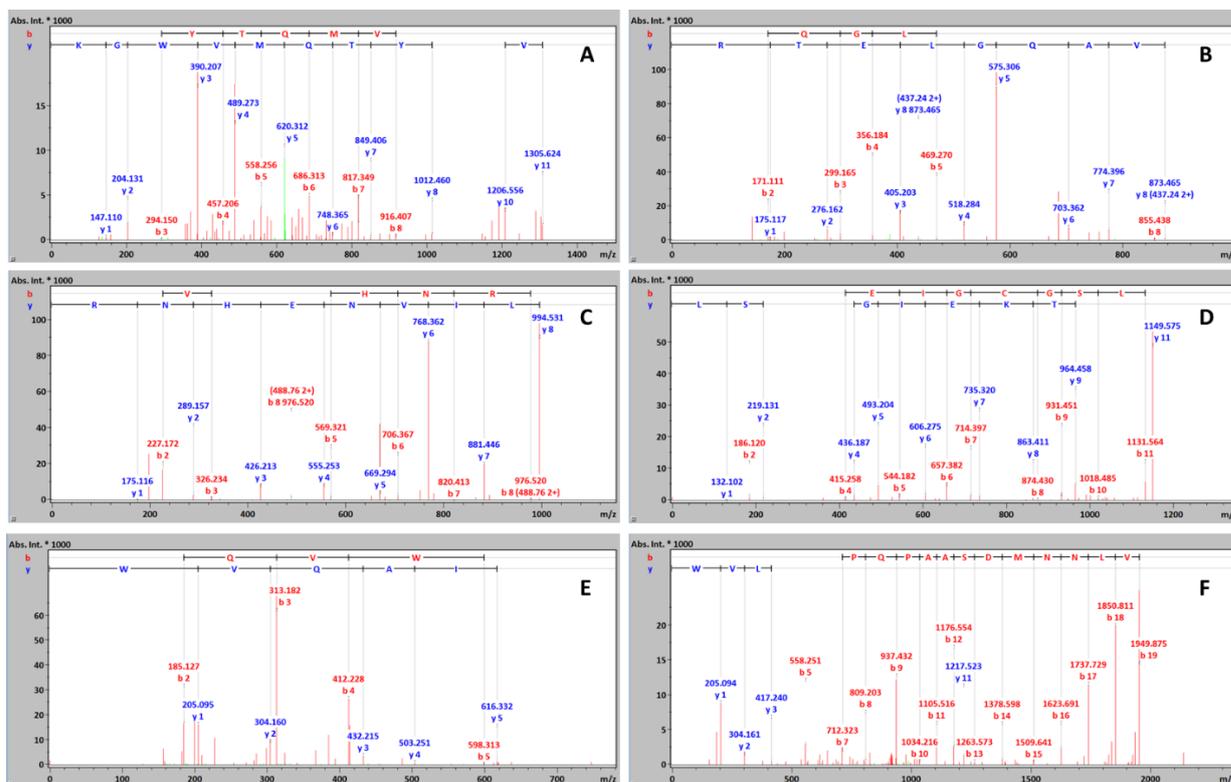
Tabela 3 – Sequências peptídicas identificadas em banco de dados pelo algoritmo MASCOT, obtidas por digestão enzimática em solução do Apo p 5.

Enzima	Sequência	m/z observado (z)	Ion Score	Posição
Tripsina	K.KLIVDEHNR.F	375.2088(+3)	43	45-53
	K.KLIVNEHNR.F	561.8152(+2)	64	45-53
	K.LIVDEHNR.F	332.5117(+3)	41	46-53
	K.LIVNEHNR.F	497.7693(+2)	53	46-53
	R.QKVAQGLETR.G	377.2119(+3)	49	56-65
	K.VAQGLETR.G	437.2393(+2)	60	58-65
	K.VGHYTMVWGK.T	435.8814(+3)	56	157-167
	K.TKEIGCGSLK.Y	364.8589(+3)	59	168-177
	K.EIGCGSLK.Y	432.2130(+2)	39	170-177
Quimiotripsina	L.IVDEHNR.F	343.8384(+3)	40	47-53
	L.IVNEHNR.F	514.7608(+2)	46	47-53
	F.RQVAQGLE	450.2704(+2)	35	55-62
	L.ETRGNPGPQPAASDMNNLVW.N	718.6614(+3)	58	63-82
	L.ETRGNPGPQPAASDMNNLVWDELAY.I	2383.2044(+1)	62	63-88
	L.VWDELAY.I	1009.4403(+1)	23	81-88
	W.NDELAY.I	724.3025(+1)	42	83-88
	Y.IAQVW.A	616.3334(+1)	30	89-93
	Y.QVGQNIAY.A	892.4352(+1)	38	112-119
	Y.TQMVG.G	664.3023(+1)	32	161-165
W.GKTKEIGCGSLK	575.2921(+2)	69	166-176	

m/z: relação massa/carga; z: carga do íon.

Fonte: dados de pesquisa.

Figura 5 – Espectros representativos de peptídeos produzidos por digestão em solução e identificados por busca em banco de dados pelo algoritmo MASCOT: VGHYTMVWGK, de íon precursor de m/z 435.8814 $[M+3H]^{3+}$ (A); VAQGLETR, de íon precursor de m/z 437.2393 $[M+2H]^{2+}$ (B); LIVNEHNR, de íon precursor de m/z 497.7693 $[M+3H]^{3+}$ (C); GKTKEIGCGSL, de íon precursor de m/z 575.2921 $[M+2H]^{2+}$ (D); IAQVW, de íon precursor de m/z 616.3334 $[M+1H]^{1+}$ (E); ETRGNPGPQPAASDMNNLVW, de íon precursor de m/z 718.6614 $[M+3H]^{3+}$ (F).



Fonte: dados de pesquisa.

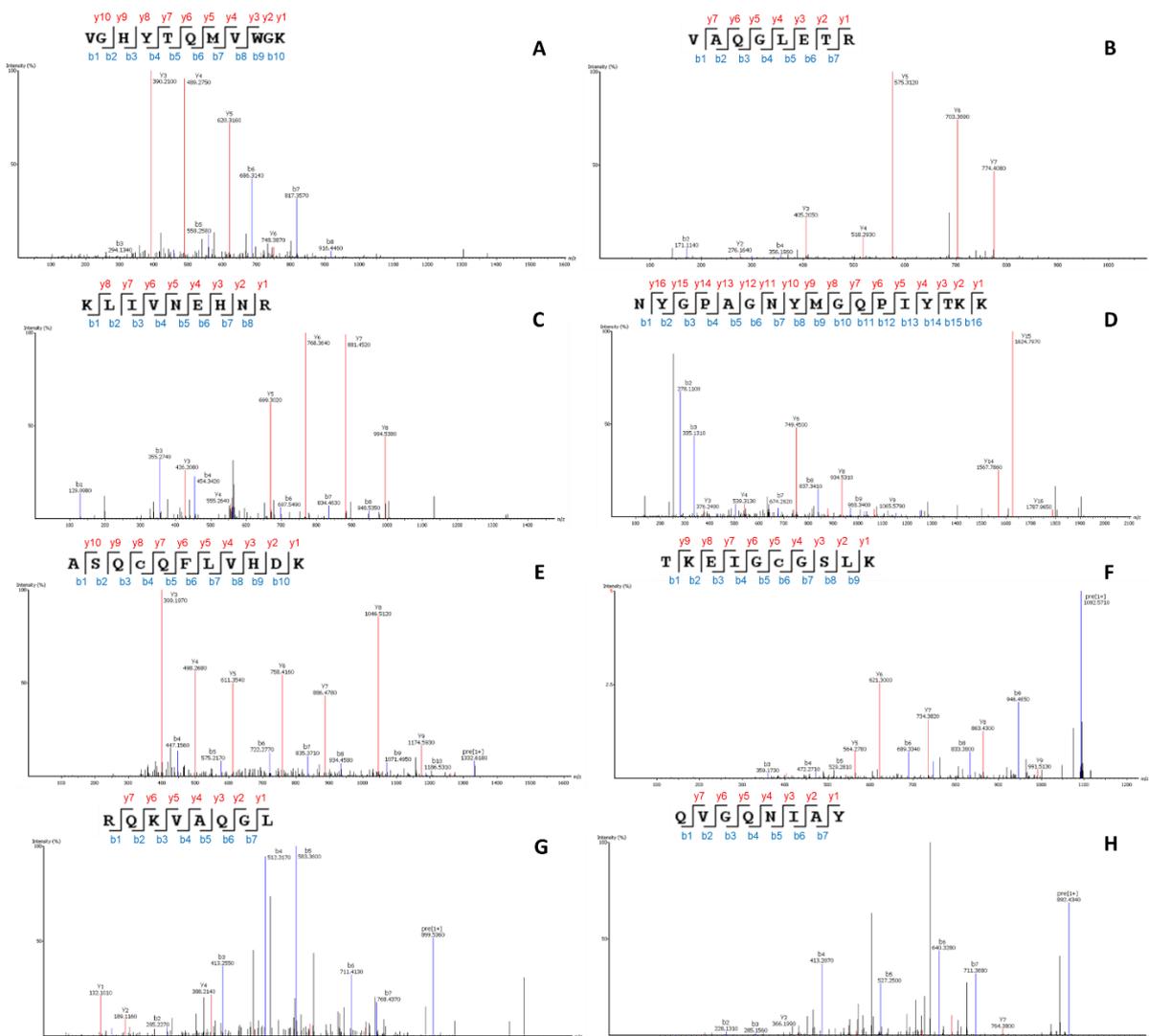
Tabela 4 – Sequências peptídicas identificadas em banco de dados pelo algoritmo PEAKS, obtidas por digestão enzimática em solução do Apo p 5.

Enzima	Sequência	m/z observado (z)	Score -10lgP	Posição	
Tripsina	K.SVGPTEEEEK.K	975.4626(+1)	26.68	36-44	
	K.SVGPTEEEEK.L	552.2855(+2)	23.40	36-45	
	K.KLIVDEHNR.F	562.3165(+2)	24.88	45-53	
	K.KLIVNEHNR.F	561.8210(+2)	23.50	45-53	
	K.LIVDEHNR.F	498.2702(+2)	18.42	46-53	
	K.LIVNEHNR.F	497.7775(+2)	26.83	46-53	
	K.VAQGLETR.G	437.2422(+2)	26.09	58-65	
	L.ETRGNPGPQPAASDMNNL.V	934.9349(+1)	25.44	63-80	
	R.GNPGPQPAAS.D	895.4269(+1)	31.31	66-75	
	R.GNPGPQPAASDMNNL.V	741.8330(+2)	28.36	66-80	
	W.ASQCFVHDK.C	666.8261(+2)	35.63	94-104	
	S.QCQFLVHDK.C	587.7880(+2)	31.63	97-104	
	K.YQVGQNIAY.A	1055.5062(+1)	18.50	111-119	
	K.QNFAK.I	607.3217(+1)	15.02	152-156	
	K.VGHYTMVWGK.T	435.8851(+3)	25.99	157-167	
	K.TKEIGCGSLK.Y	1092.5717(+1)	42.16	168-177	
	K.EIGCGSLK.Y	432.2168(+2)	32.12	170-177	
	C.NYGPAGNYMGQPIYTK.K	887.4217(+2)	44.06	191-206	
	C.NYGPAGNYMGQPIYTKK	634.6413(+3)	48.36	191-207	
	A.GNYMGQPIYTK.K	636.3081(+2)	29.31	196-206	
	A.GNYMGQPIYTKK	700.3592(+2)	35.74	196-207	
	Quimiotripsina	F.RQKVAQGL.E	450.2690(+2)	20.70	55-62
		L.ETRGNPGPQPAASDMNNLVW.N	1077.4861(+2)	33.70	63-82
		W.ASQCF.L	740.2912(+2)	15.24	94-99
		Y.QVGQNIAY.S	892.4370(+1)	26.93	112-119
		F.AKVGHY.T	674.3484(+1)	24.02	155-160
W.GKTKEIGCGSLK.K		575.2922(+2)	37.80	166-176	
W.GKTKEIGCGSLKY.M		720.8659(+2)	33.41	166-178	
Y.MGQPIY.T		708.3251(+1)	20.00	199-204	
Proteinase K	R.GNPGPQPA.A	737.3534(+1)	15.99	65-73	

m/z: relação massa/carga; z: carga do íon.

Fonte: dados de pesquisa.

Figura 6 – Espectros representativos de peptídeos produzidos por digestão em solução e identificados por busca em banco de dados pelo algoritmo PEAKS: VGHYTMVWGK, de íon precursor de m/z 435.8851 $[M+3H]^{3+}$ (A); VAQGLETR, de íon precursor de m/z 437.2422 $[M+2H]^{2+}$ (B); KLIVNEHNR, de íon precursor de m/z 561.8210 $[M+2H]^{2+}$ (C); NYGPAGNYMGQPIYTKK, de íon precursor de m/z 634,6413 $[M+3H]^{3+}$ (D); ASQCQLVHDK, de íon precursor de m/z 666.8261 $[M+2H]^{2+}$ (E); TKEIGCGSLK, de íon precursor de m/z 1092.5717 $[M+1H]^{1+}$ (F); RQKVAQGL, de íon precursor de m/z 450.2690 $[M+2H]^{2+}$ (G); QVGQNIAY, de íon precursor de m/z 892.4370 $[M+1H]^{1+}$ (H).



Fonte: dados de pesquisa.

Um sequenciamento completo baseado em busca em banco de dados não foi possível, talvez por uma baixa eficiência das digestões enzimáticas. A falta de dados moleculares de *A. pallens* nos quais se basear também é um fator a se levar em consideração. Por essas razões, uma abordagem complementar por sequenciamento *de novo* foi utilizada.

Os peptídeos mostrados nas tabelas 3 e 4 foram usados em conjunto com os peptídeos montados por sequenciamento *de novo* (Tabela 5, Figura 7) para cobrir a sequência completa do Apo p 5 (Figura 8). Não houve identificação de peptídeos gerados por pepsina na digestão *in gel*.

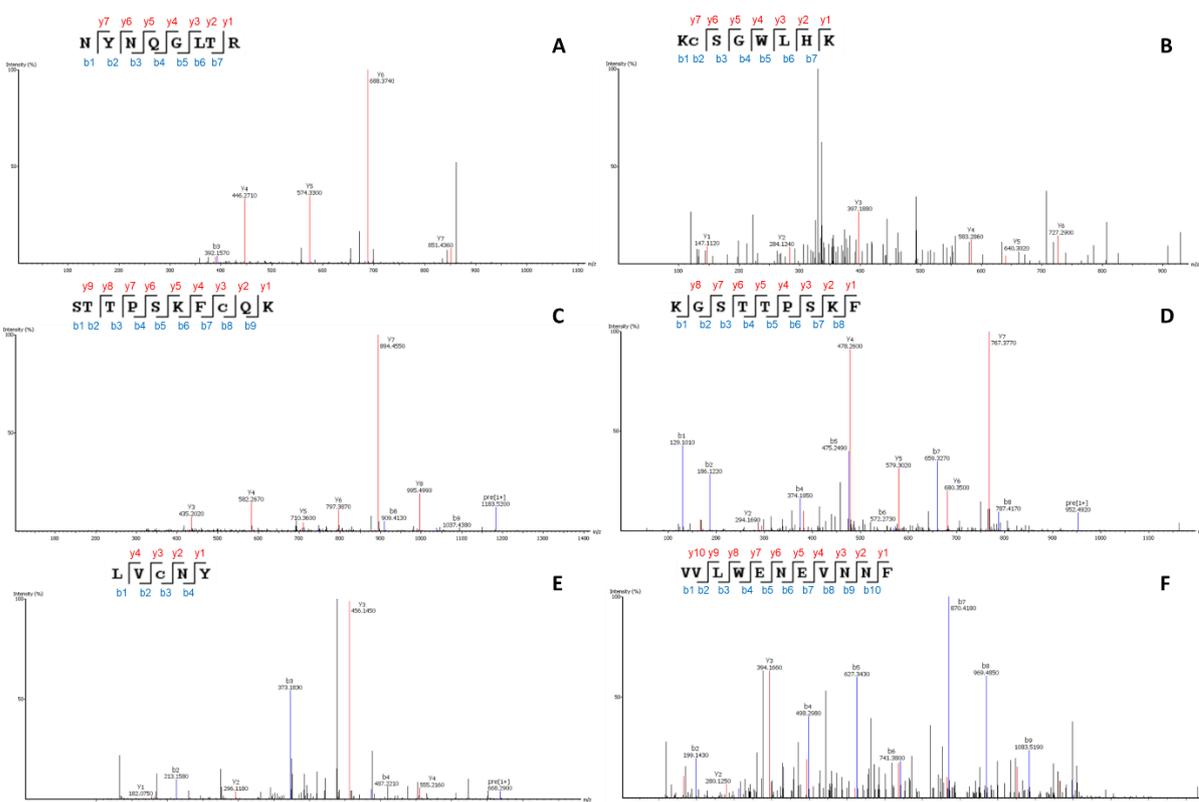
Tabela 5 – Peptídeos observados por sequenciamento *de novo*.

Enzima	Sequência	m/z observado (z)	ALC (%)	Posição
Tripsina	NEYCVLAK	498.7466(+2)	58	1-8
	KCSGWLHK	508.2162(+2)	63	8-15
	GCQVK	591.2982(+1)	55	16-20
	STTPSKFCAGK	592.2948(+2)	74	22-32
	AGKYLK	679.4417(+1)	30	30-35
	VVLWENEVNNFNYNQGLTR	1155.0574(+2)	85	133-151
	YMNK	555.4846(+1)	67	178-181
Quimiotripsina	KGSTTPSKF	476.7521(+2)	94	20-28
	ASTGGFPDLVSLVVLW	830.9390(+2)	76	121-136
	VVLWENEVNNF	681.8310(+2)	98	133-143
	NYNQGLTR	483.2473(+2)	78	144-151
	NYNQGLTRQNF	677.8187(+2)	97	144-154
	GMQPLY	708.3251(+1)	69	182-187
	LVCNY	668.2957(+1)	97	188-192
Pepsina	CLNTE	636.4634(+1)	45	105-109

m/z: relação massa/carga; z: carga do íon; ALC: *Average Local Coverage*.

Fonte: dados de pesquisa.

Figura 7 – Espectros representativos de peptídeos identificados por sequenciamento *de novo* pelo algoritmo PEAKS: NYNQGLTR, de íon precursor de m/z 483.2473 $[M+2H]^{2+}$ (A); KCSGWLHK, de íon precursor de m/z 508.2162 $[M+2H]^{2+}$ (B); STTPSKFCAGK, de íon precursor de m/z 592.2948 $[M+2H]^{2+}$ (C); KGSTTPSKF, de íon precursor de m/z 476.7521 $[M+2H]^{2+}$ (D); LVCNY, de íon precursor de m/z 668.2957 $[M+1H]^{1+}$ (E); VVLWENEVNNF, de íon precursor de m/z 681.8310 $[M+2H]^{2+}$ (F).



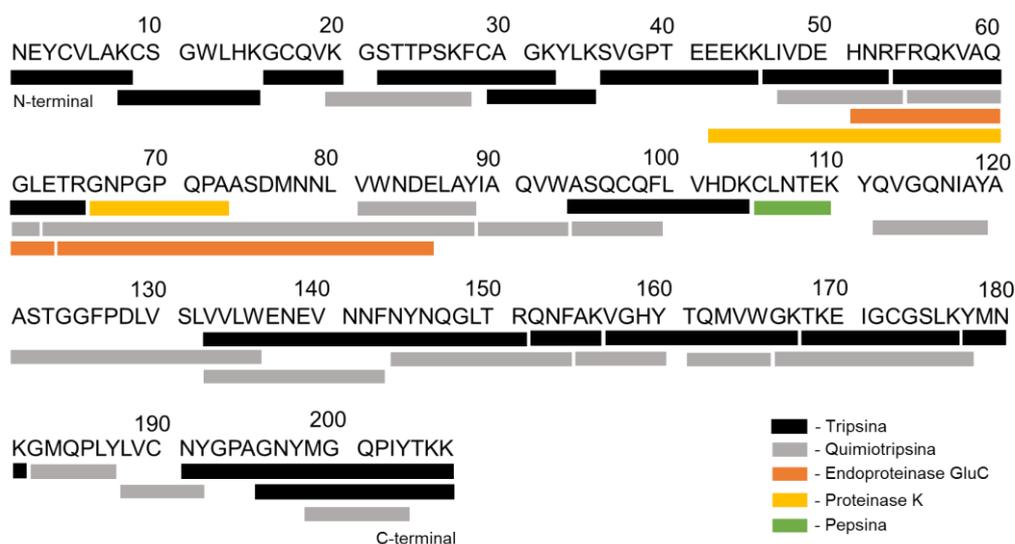
Fonte: dados de pesquisa.

As enzimas possuem preferência por clivar a cadeia polipeptídica após determinados resíduos de aminoácidos. A quimiotripsina, por exemplo, cliva preferencialmente após resíduos de triptofano (W), fenilalanina (F) e tirosina (Y) e, em menor grau, após leucina (L), metionina (M) e histidina (H). A tripsina possui especificidade maior e cliva apenas após resíduos de arginina (R) e lisina (K) (KEIL, 1992). Fragmentos com clivagens inespecíficas (semitrípticos) eventualmente podem ser gerados, como ocorreu com peptídeos como W.ASQCQFLVHDK.C e C.NYGPAGNYMGQPIYTKK (Tabela 3). A obtenção de fragmentos semitrípticos já foi observada em experimentos do grupo outras vezes (SOUZA et al., 2019).

A função de sequenciamento *de novo* do PEAKS Studio 7 traz por padrão resíduos de leucina na presença tanto de leucina quanto de isoleucina. Uma vez que o genoma e as proteínas do veneno de vespas do gênero *Apoica* nunca foram

estudados, optou-se por manter as informações fornecidas pelo algoritmo ao invés de supor a existência de uma isoleucina quando esta estava presente na sequência de Pol d 5, usada como referência principal para o sequenciamento. Além disso, as propriedades físico-químicas de Leu e Ile são praticamente idênticas e a troca de uma pela outra pouco afetaria a estrutura tridimensional e a função da proteína.

Figura 8 – Estrutura primária do Apo p 5, com os peptídeos usados para o sequenciamento representados em barras.



Fonte: dados de pesquisa.

A estrutura primária final é composta por 207 resíduos de aminoácidos (Figura 8). A ferramenta Compute pI/Mw do ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) calculou para a proteína um pI e uma massa molecular teóricos de 8,82 e 23.162,37 Da, respectivamente.

O Apo p 5 foi alinhado com a sequência do Ag 5 maduro de seis outras espécies de himenópteros sociais de elevada importância clínica: *Polybia paulista* (Poly p 5 - UniProtKB/Swiss-Prot: E7D4M5), *Polistes dominula* (Pol d 5 - UniProtKB/Swiss-Prot: P81656), *Vespa vulgaris* (Ves v 5 - UniProtKB/Swiss-Prot: Q05110), *Dolichovespula maculata* (Dol m 5 - UniProtKB/Swiss-Prot: P10737), *Vespa crabro* (Vesp c 5 - UniProtKB/Swiss-Prot: P35781) e *Solenopsis invicta* (Sol i 3 - UniProtKB/Swiss-Prot: P35778) (Figura 10A). A ferramenta utilizada para o alinhamento múltiplo foi o Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Figura 9).

Figura 9 – Alinhamento múltiplo do Apo p 5 com o Ag 5 de outras espécies de Hymenoptera (A) e matriz de porcentagem de identidade entre os alérgenos (B). Asteriscos (*) indicam locais idênticos, dois pontos (:) resíduos com alta similaridade química (score > 0.5) e pontos (.) resíduos de baixa similaridade química (score < 0.5).

A

Apo p 5	NEYCVLAKCS--GWLHKGCQVKGSTTPS-KFCAGKYLKSVGPTEEEKKLIVDEHNRFRQK	57
Pol d 5	NDYCKI-KCS--SGVHTVCQYGESTKPS-KNCAGKLIKSVGPTEEEKKLIVEEHNRFRQK	56
Poly p 5	NKYCNI-KCS--KVAHTVCQTGESTKPSKNCAKVSI TSVGVTEEEKKLIVDEHNRFRQK	57
Dol m 5	NNYCKIKCSR---GIHTLCKFGTSMKP---NCGSKLVKVGVSNDKNEIVNRHNQFRQK	54
Vesp c 5	NNYCKIKCRS---GIHTLCKYGTSTKP---NCGKNVVKASGLTKQENLEILKQHNEFRQK	54
Ves v 5	NNYCKIKCLK--GGVHTACKYG-SLKP---NCGNKVVVSYGTLTKQEKQDILKEHNDFRQK	54
Sol i 3	TNYCNLQSCKRNNAIHTMCQYTSPTPG--PMCL--EYSNVGFTDAEKDAIVNKHNELRQR	56
	..** : * . * : * * : . * : * : . ** : ** :	
Apo p 5	VAQGLETRGNPGQPAAASDMNNLVWDELAYIAQVWASQCQFLVHDKCLNTEKYQVGQNI	117
Pol d 5	VAKGLETRGNPGQPAAASNMNNLVWDELAKIAQVWASQCQILVHDKCRNTEKYQVGQNI	116
Poly p 5	VAQGLETRGNPGQPAAASDMNNLVWDELAYIAQVWASQCQFFVHDKCRNTAQYQVGQNI	117
Dol m 5	VAKGLETRGNPGQPAPAKNMNVLVWDELAKIAQTWANQCSF-GHDQCRNTEKYQVGQNV	113
Vesp c 5	VARGLETRGNPGQPAPAKSMNTLVWDELAIQIAQVWANQCNY-GHDNCRNSAKYSVGQNI	113
Ves v 5	IARGLETRGNPGQPAPAKNMNVLVWDELAYVAQVWANQCQY-GHDTCRDVAKYQVGQNV	113
Sol i 3	VASGKEMRGTNGPQPPAVKMPNLTWDELATIAQRWANQCTF-EHDACRNVRFVAVGQNI	115
	: * * * * . * * * * * . * * . * : * * : * * * * . * * * * : : * * * * :	
Apo p 5	AYAASTG-GFPDLVSLVVLWENEVNNFNYNQG---L-TRQNFQVGHYTMVWVGKTKEIG	172
Pol d 5	AYAGSSN-HFPSVTKLIQLWENEVKDFNYNTG---I-TNKNFGKVGHYTMVWVGNTKEVG	171
Poly p 5	AYSASTA-AYPGVVKLIVLWENEVKDFNYNTG---I-TKENFAKVGHYTMVWVWAKTKEVG	172
Dol m 5	AIASLTGNSYATMSKLIEMWENEVKDFNPKKG---TMGDNNFSKVGHYTMVWVGKTKEIG	170
Vesp c 5	AEGSTTADNFGSVSNMVKMWEDEVKDYQYGS-----PKNKLNKVGHYTMVWVWAKTKEIG	167
Ves v 5	ALTGSTAAKYDDPVKLVKMWEDVKDYNPKKK---F-SGNDFLKTGHYTMVWVWANTKEVG	169
Sol i 3	AATSSSGKNKSTPNEMILLWYNEVKDFDNRWISSFSDDNILMKVGHYTMVWVWAKTKEIG	175
	* . : : . : : * : * * : : : : : : : * . * * * * : * * : * * : * :	
Apo p 5	CGSLKYMN-KGMQPLYLVCNYGPAGNYMGQPIYTKK-	207
Pol d 5	CGSLKYVE-KNMQIHYLICNYGPAGNYLGQPIYTKK-	206
Poly p 5	CGSIKYIE-KGMKSHYLVLCNYGPAGNVLGAQIYEIK-	207
Dol m 5	CGSVKYIE-NNWHTHYLVLCNYGPAGNYMDQPIYERK-	205
Vesp c 5	CGSIKYIE-NGWHRHYLVLCNYGPAGNVGNEPIYERK-	202
Ves v 5	CGSIKYIQ-EKWHKHLYLVLCNYGPSGNFMNEELYQTK-	204
Sol i 3	CGRIMFKEPDNWTKHLYLVLCNYGPAGNVLGAPIYEIKK	212
	** : : : . ** : * * * * : * * . : * *	

Apo p 5	100.00								
Pol d 5	77.18	100.00							
Poly p 5	74.76	78.16	100.00						
Dol m 5	60.10	66.34	61.88	100.00					
Vesp c 5	55.22	60.00	62.00	68.81	100.00				
Ves v 5	54.19	59.41	59.41	64.53	68.66	100.00			
Sol i 3	47.29	50.00	52.48	51.23	51.50	45.05	100.00		

B

Fonte: dados de pesquisa.

Como esperado, porcentagens maiores de identidade foram encontradas com os alérgenos de vespas pertencentes à subfamília Polistinae, Pol d 5 (77,18 %) e Poly p 5 (74,18 %). O fato de vespas do gênero *Apoica* ocorrerem em parte do Hemisfério Norte pode explicar o porquê de a identidade ser maior com *P. dominula* do que com *P. paulista*. Polimorfismos em indivíduos dentro da espécie também

devem ser levados em conta em comparações. Menor identidade foi encontrada para as espécies *D. maculata*, *V. crabro* e *V. vulgaris*, as três endêmicas do Hemisfério Norte e pertencentes à subfamília Vespinae (CARPENTER, 1991). A porcentagem mais baixa foi para a formiga *S. invicta* (47,29 %) (Figura 8B).

4.5 Predição de modificações pós-traducionais e epítomos lineares

Predições feitas pelo GlycoEP (<http://crdd.osdd.net/raghava/glycoep/>) baseado em sequências glicosiladas de banco de dados apontaram uma única potencial N-glicosilação no resíduo Asn107 (Tabela 6). No caso de O-glicosilações, foram apontados 10 possíveis sítios em resíduos de serina e treonina (Tabela 7). O programa NetPhos previu 18 pontos de fosforilação em potencial após buscas em banco de dados de sequências fosforiladas (Tabela 8).

Tabela 6 – Possíveis sítios de N-glicosilação na estrutura primária do Apo p 5 previstos pela ferramenta *online* GlycoEP. Scores positivos indicam resíduos potenciais.

Posição	Resíduo	Score (BPP)	Score (ASA)	Estado
1	<u>NE</u> Y	-1.2379	-0.9624	Não glicosilado
52	<u>NR</u> F	-1.0995	-1.2051	Não glicosilado
67	<u>NP</u> G	-1.0495	-1.9766	Não glicosilado
78	<u>NN</u> L	-0.7365	-1.2090	Não glicosilado
79	<u>NL</u> V	-0.8315	-1.1986	Não glicosilado
83	<u>ND</u> E	-1.0306	-0.8274	Não glicosilado
107	<u>NT</u> E	1.0656	-1.1284	Possível glicosilação
116	<u>NI</u> A	-1.0133	-1.1368	Não glicosilado
138	<u>NE</u> V	-1.0552	-1.2707	Não glicosilado
141	<u>NN</u> F	-0.6224	-1.0261	Não glicosilado
142	<u>NF</u> N	-0.9381	-1.0678	Não glicosilado
144	<u>NY</u> N	-0.7676	-0.8979	Não glicosilado
146	<u>NQ</u> G	-0.7445	-0.6396	Não glicosilado
153	<u>NF</u> A	-0.8805	-1.1130	Não glicosilado
180	<u>NK</u> G	-1.0652	-1.0350	Não glicosilado
191	<u>NY</u> G	-1.0629	-1.3605	Não glicosilado
197	<u>NY</u> M	-0.8379	-0.8904	Não glicosilado

BPP: *Binary profile of patterns*; ASA: *Average Surface Accessibility*.

Fonte: dados de pesquisa.

Tabela 7 - Possíveis sítios de O-glicosilação na estrutura primária do Apo p 5 previstos pela ferramenta *online* GlycoEP. Scores positivos indicam resíduos potenciais.

Posição	Resíduo	Score (CPP)	Score (ASA)	Estado
10	S	-0.0717	-0.0603	Não glicosilado
22	S	-0.0081	-0.1840	Não glicosilado
23	T	-0.0154	-0.2993	Não glicosilado
24	T	-0.0154	0.3085	Possível glicosilação
26	S	-0.0232	-0.1326	Não glicosilado
36	S	-0.0124	0.1155	Possível glicosilação
40	T	-0.1164	-0.4642	Não glicosilado
64	T	0.0250	-0.1489	Potencial glicosilação
75	S	-0.0271	0.0794	Possível glicosilação
95	S	-0.1014	-0.3306	Não glicosilado
108	T	-0.1787	0.0203	Possível glicosilação
122	S	-0.1984	0.0203	Possível glicosilação
123	T	-0.1796	0.2786	Possível glicosilação
131	S	-0.0071	-0.4642	Não glicosilado
150	T	-0.0149	0.2786	Possível glicosilação
161	T	-0.0465	0.0794	Possível glicosilação
168	T	-0.1128	-0.1326	Não glicosilado
175	S	-0.0745	-0.1840	Não glicosilado
205	T	0.0230	-0.4642	Possível glicosilação

CPP: *Composition profile of patterns*; ASA: *Average Surface Accessibility*.
Fonte: dados de pesquisa.

Tabela 8 - Possíveis sítios de fosforilação na estrutura primária do Apo p 5 previstos pela ferramenta *online* NetPhos. Scores acima de 0.5 indicam resíduos potenciais.

Posição	Resíduo	Score	Estado
3	Y	0.568	Possível fosforilação
10	S	0.493	Não fosforilado
22	S	0.760	Possível fosforilação
23	T	0.715	Possível fosforilação
24	T	0.920	Possível fosforilação
26	S	0.705	Possível fosforilação
33	Y	0.430	Não fosforilado
36	S	0.717	Possível fosforilação
40	T	0.588	Possível fosforilação
64	T	0.555	Possível fosforilação
75	S	0.844	Possível fosforilação
88	Y	0.572	Possível fosforilação
95	S	0.640	Possível fosforilação
108	T	0.702	Possível fosforilação

111	Y	0.802	Possível fosforilação
119	Y	0.465	Não fosforilado
122	S	0.481	Não fosforilado
123	T	0.624	Possível fosforilação
131	S	0.475	Não fosforilado
145	Y	0.514	Possível fosforilação
150	T	0.435	Não fosforilado
160	Y	0.476	Não fosforilado
161	T	0.435	Não fosforilado
168	T	0.453	Não fosforilado
175	S	0.809	Possível fosforilação
178	Y	0.922	Possível fosforilação
187	Y	0.425	Não fosforilado
192	Y	0.409	Não fosforilado
198	Y	0.408	Não fosforilado
204	Y	0.415	Não fosforilado
205	T	0.733	Possível fosforilação

Fonte: dados de pesquisa.

O-glicanos já foram encontrados em diversos alérgenos, especialmente de plantas, mas são menos comuns e aparentam ter menor relevância clínica do que N-glicanos (ALTMANN, 2007). Alérgenos glicosilados de insetos tipicamente envolvem oligossacarídeos contendo uma α 1,3-fucose N-ligada a um resíduo de asparagina, formando CCDs altamente reativos a IgE. O papel específico desses carboidratos não é conhecido, ainda que funções como solubilidade, manutenção estrutural e proteção contra proteases já tenham sido propostas (ALTMANN, 2007; HEMMER et al., 2001; SANTOS-PINTO et al., 2014). Em vespas sociais, N-glicosilações já foram encontradas em hialuronidases (*V. vulgaris*, *V. maculifrons*, *D. maculata*, *P. paulista*, *P. anularis*), fosfolipases (*D. maculata*, *P. paulista*), dipeptidil peptidases (*V. vulgaris*, *P. dominula*), proteases (*P. dominula*), vitelogenina (*V. vulgaris*) e antígenos 5 (*V. crabro*, *V. magnifica*, *V. mandarina*) (JAKOB et al., 2017b). Uma glicosilação foi detectada na posição Lys141 de Poly p 5, mas sua estrutura química não foi investigada (SANTOS-PINTO et al., 2014). O fato de não ser N-ligado a uma asparagina já torna o alérgeno, por definição, desprovido de CCDs.

Fosforilações são uma das modificações pós-traducionais mais comuns em proteínas. Estão essencialmente presentes em redes metabólicas e cascatas de sinalização celular por serem mecanismos conservados de ativação e desativação de enzimas. Ainda que não seja possível apontar exatamente a influência da fosforilação

no antígeno 5 (especialmente por sua função biológica ser desconhecida), seu papel pode estar relacionado com a manutenção da conformação do Apo p 5 ou com a interação com outras proteínas (JOHNSON; BARFORD, 1993).

Há oito cisteínas na sequência do Ag 5 dos himenópteros incluídos na comparação com Apo p 5. Por similaridade, inferiu-se que em Apo p 5 elas formam quatro pontes dissulfeto: Cys4↔Cys17, Cys9↔Cys105, Cys29↔Cys97 e Cys173↔Cys190 (SANTOS-PINTO et al., 2014). Essas ligações covalentes mantêm a rigidez da estrutura tridimensional do alérgeno.

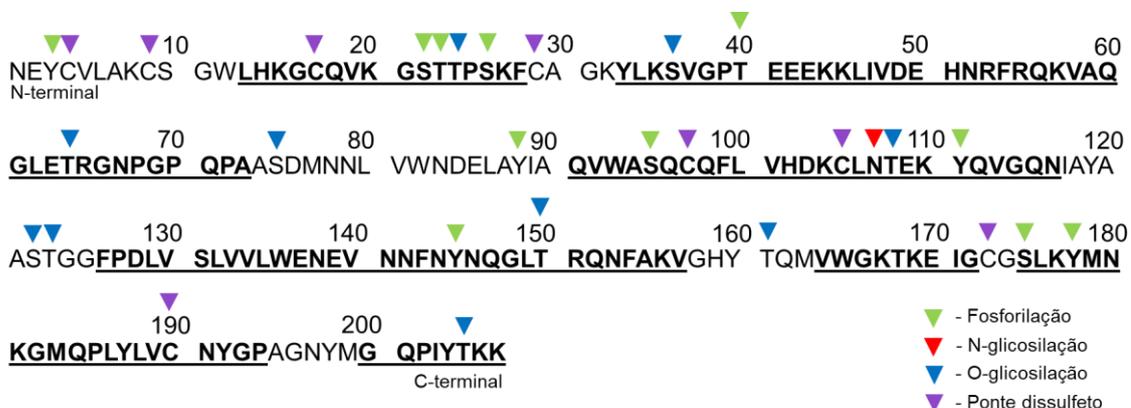
O BcePred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) prevê epítomos lineares de linfócitos B aplicando para cada resíduo de aminoácido da sequência uma pontuação de acordo com sua propensão a determinada propriedade físico-química (Quadro 1). Uma média aritmética da pontuação de sete resíduos seguidos é calculada. Valores mais altos do que um limite definido indicam possíveis regiões antigênicas (PELLEQUER; WESTHOLF; REGENMORTEL, 1991). Os valores limites padrões fornecidos pela ferramenta foram mantidos. As quatro propriedades escolhidas para o presente experimento e seus respectivos epítomos são mostrados no Quadro 1. Sobrepostos, os epítomos totalizam sete regiões da estrutura primária do Apo p 5 (Figura 10).

Quadro 1 – Epítomos lineares de linfócitos B previstos pela ferramenta *online* BcePred com base em propriedades físico-químicas específicas.

Acessibilidade	Exposição	Polaridade	Propensão antigênica
KGSTTPSKF	GPTEEEKKLI	HKGCQVK	LHKGCQVK
VGPTTEEEKKLIVDEHNRFRQK VAQGLETRGNPGPQPA	EHNRFQKQV	VGPTTEEEKKLIVDEHNRFRQKVA	YLKSVGP
KCLNTEKYQVGQN	QPIYTCK	KCLNTEK	SQCQFLVHDKCLN
WENEVNNFNYNQGLTRQ NFAKV		VWGKTKEI	FPDLVSLVVLWENE
VWGKTKEIG			MQPLYLVCNYGP
SLKYMNKGMQP			

Fonte: dados de pesquisa.

Figura 10 – Possíveis epítomos lineares de linfócitos B (sublinhados em preto) e modificações pós-traducionais na estrutura primária do Apo p 5. Para os resíduos identificados como possíveis sítios tanto de glicosilação como de fosforilação, a glicosilação é priorizada.



Fonte: dados de pesquisa.

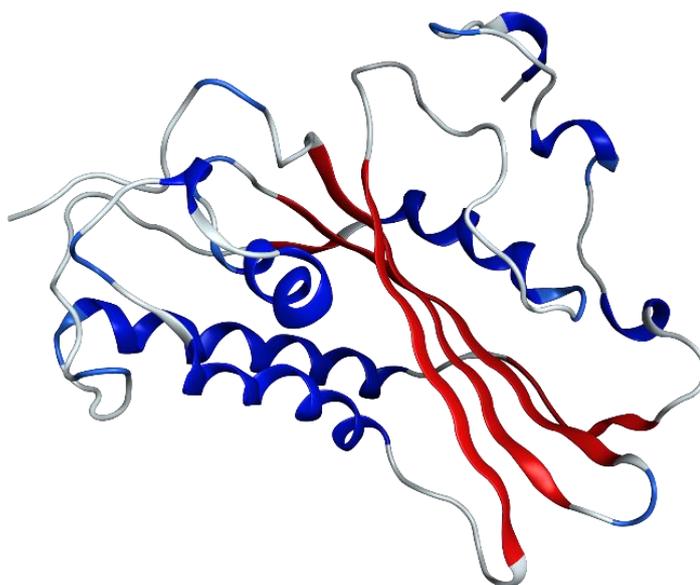
Santos-Pinto e colaboradores mapearam os epítomos lineares do Ag 5 de *P. paulista* (SANTOS-PINTO et al., 2015). Das nove sequências reativas a IgG detectadas em Poly p 5, duas (epítomos 1 e 2) possuem identidade de 100 % com sequências trazidas pelo BcePred para Apo p 5. Os epítomos 4, 5 e 8 possuem identidade de 72,7 %, 75 % e 63,6 %, respectivamente. Para os epítomos 3, 6, 7 (este também reconhecido por IgE) e 9, não houve correspondência com as sequências antigênicas trazidas pelo programa, ainda que as identidades com as regiões equivalentes em Apo p 5 sejam 100 %, 81,8 %, 85,2 % e 45,6 %, respectivamente. Por outro lado, a região do epítopo 7 (VGHYVWAKTKE) responsável por interagir com anticorpos IgE (WAKTKE) possui identidade de 83,3 % com uma sequência dentro de um epítopo previsto pelo BcePred, sugerindo que esse trecho do Apo p 5 (WGKTKKE, posição 165-170) é responsável por torná-lo um alérgeno.

4.6 Estrutura tridimensional do Apo p 5

O template para a modelagem molecular do Apo p 5 foi o Ag 5 de *Vespula vulgaris* (PDB ID: 1QNX), cuja estrutura foi elucidada por cristalografia de raios-X com uma resolução de 1.9 Å. Ves v 5 adota um padrão estrutural do tipo sanduíche α - β - α : uma camada superior com cinco α -hélices, uma camada intermediária

formada por quatro dobras- β antiparalelas e uma camada inferior com outras três α -hélices (HENRIKSEN et al., 2001). O Apo p 5 segue esse mesmo padrão (Figura 11).

Figura 11 – Modelo tridimensional do Apo p 5, gerado pelo MODELLER.



Fonte: dados de pesquisa.

O modelo 3D revelou uma proteína composta por 28 % de α -hélices, 17,9 % de folhas- β e 54,1 % de *loops* (Figura 11). A grande quantidade de *loops* pode estar relacionada com o caráter alergênico do Apo p 5, uma vez que eles estão mais expostos do que outros elementos de estrutura secundária. Regiões expostas de alérgenos tendem a abrigar epítomos de linfócitos B para permitir a interação antígeno-anticorpo enquanto a proteína está intacta. O mesmo não se vê para epítomos de linfócitos T, que podem estar em qualquer região da proteína por serem apresentados a células efectoras do sistema imune quando o alérgeno já foi degradado e processado (DALL'ANTONIA et al., 2014; SANTOS-PINTO et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

O antígeno 5 é uma proteína presente no veneno de diversas espécies de himenópteros sociais. Embora sua ação biológica seja desconhecida, seu papel em reações de hipersensibilidade já foi extensivamente estudado (HOFFMAN, 2006; SCHIENER et al., 2017). A caracterização do Ag 5 das diversas espécies clinicamente relevantes é de vital importância para a redução da incidência de reatividade cruzada em testes diagnósticos.

Neste trabalho, propôs-se a identificar e caracterizar o Ag 5 da vespa social neotropical *Apoica pallens* por abordagem proteômica. Combinando eletroforese unidimensional, cromatografia líquida, espectrometria de massas e ferramentas *in silico*, uma proteína completa pôde ser informada. Estrutura primária, secundária e terciária se mostraram semelhantes às do Ag 5 de outras vespas da subfamília Polistinae. A alergenicidade do Apo p 5 também foi confirmada por ensaios imunológicos com soros de pacientes alérgicos ao veneno de vespas. Domínios proteicos estruturais e alergênicos conservados fornecem informações sobre relações filogenéticas entre grupos de himenópteros.

A descrição deste alérgeno é um adicional ao ainda seletivo conhecimento dos componentes alergênicos do veneno de vespas sociais neotropicais. A aplicação clínica desses dados se reverteria em maior exatidão na identificação do inseto causador da sensibilização e adoção da estratégia mais eficiente de imunoterapia para cada caso.

REFERÊNCIAS

- ALTMANN, F. The role of protein glycosylation in allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 142, p. 99–115, 2007.
- ARÉVALO, E. et al. The phylogeny of the social wasp subfamily Polistinae: evidence from microsatellite flanking sequences, mitochondrial COI sequence, and morphological characters. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, n. 8, p. 1–16, 2004.
- BAZON, M. L. et al. Heterologous expression, purification and immunoreactivity of the antigen 5 from polybia paulista wasp venom. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2017.
- BILÒ, M. B. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, n. Supplem. 95, p. 35–37, 2011.
- BILÒ, M. B.; BONIFAZI, F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 10, p. 1467–1476, 2009.
- BLANK, S. et al. Evaluation of different glycoforms of honeybee venom major allergen phospholipase A2 (Api m 1) produced in insect cells. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 4, p. 415–22, 2011.
- BLANK, S.; BILÒ, M. B.; OLLERT, M. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: important steps towards precision medicine. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 48, n. 4, p. 354–364, 2018.
- BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1351–1362, 1999.
- BONIFAZI, F. et al. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. **Allergy**, v. 60, n. 12, p. 1459–1470, 2005.
- BREHLER, R.; GRUNDMANN, S.; STÖCKER, B. Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 13, n. 4, p. 360–364, 2013.
- CARPENTER, J. M. Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. **The Social Biology of Wasps**, p. 7–32, 1991.
- CARUSO, B. et al. Wasp venom allergy screening with recombinant allergen testing. Diagnostic performance of rPol d 5 and rVes v 5 for differentiating sensitization to *Vespula* and *Polistes* subspecies. **Clinica Chimica Acta**, v. 453, p. 170–173, 2016.
- CHAUHAN, J. S.; RAO, A.; RAGHAVA, G. P. S. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 1988.

DALL'ANTONIA, F. et al. Structure of allergens and structure based epitope predictions. **Methods**, v. 66, n. 1, p. 3–21, 2014.

DIAS, N. B. et al. Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): a comparison of the intra- and inter-colony compositions. **Peptides**, v. 51, p. 122–130, 2014.

GIBBS, G. M.; ROELANTS, K.; O'BRYAN, M. K. The CAP Superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins - Roles in reproduction, cancer, and immune defense. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 865–897, 2008.

GOLDEN, D. B. K. Insect sting allergy and venom immunotherapy: a model and a mystery. **Current Reviews of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 3, p. 439–447, 2005.

GOLDEN, D. B. K. Insect sting anaphylaxis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 27, n. 2, p. 1–11, 2007.

GUIMARÃES, M. Death swarm. **Pesquisa FAPESP**, n. 153, p. 50–53, 2008.

HEMMER, W. et al. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 6, p. 1045–1052, 2001.

HENRIKSEN, A. et al. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 45, n. 4, p. 438–448, 2001.

HOFFMAN, D. R. Hymenoptera venom allergens. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 30, n. 2, p. 109–128, 2006.

HOU, M. H. et al. Crystal structure of vespid phospholipase A1 reveals insights into the mechanism for cause of membrane dysfunction. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 68, p. 79–88, 2016.

HSIEH, S.-K. et al. Functional expression and characterization of dipeptidyl peptidase IV from the black-bellied hornet *veVpa basalis* in Sf21 insect cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 12, p. 2371–2375, 2011.

HUNT, J. H.; JEANNE, R. L.; KEEPING, M. G. Observations on *Apoica pallens*, a nocturnal Neotropical social wasp (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae, Epiponini). **Insectes Sociaux**, v. 42, n. 3, p. 223–236, 1995.

JAKOB, T. et al. Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: current concepts and

developments with special focus on molecular allergy diagnostics. **Allergo Journal International**, v. 26, n. 3, p. 93–105, 2017a.

JAKOB, T. et al. Component resolved diagnostics for hymenoptera venom allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 17, n. 5, p. 363–372, 2017b.

JOHNSON, L. N.; BARFORD, D. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. **Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structures**, v. 22, p. 199–232, 1993.

JUSTO-JACOMINI, D. L. et al. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v. 64, p. 70–80, 2013.

JUSTO-JACOMINI, D. L. et al. Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom. **Toxicon**, v. 82, p. 104–111, 2014.

KEIL, B. **Specificity of Protelysis**. 1. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1992.

KLOPFSTEIN, S. et al. The Hymenopteran tree of life: evidence from protein-coding genes and objectively aligned ribosomal data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–23, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LARCHÉ, M.; AKDIS, C. A.; VALENTA, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 761–771, 2006.

LEE, E. K. et al. Characterization of the major allergens of *Pachycondyla chinensis* in ant sting anaphylaxis patients. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 4, p. 602–607, 2009.

LEE, S. H.; BAEK, J. H.; YOON, K. A. Differential properties of venom peptides and proteins in solitary vs. social hunting wasps. **Toxins**, v. 8, n. 32, p. 1–29, 2016.

LOCHER, G. D. A. et al. The social wasp fauna of a riparian forest in Southeastern Brazil (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 2, p. 225–233, 2014.

MATYSIAK, J. et al. Shotgun proteome analysis of honeybee venom using targeted enrichment strategies. **Toxicon**, v. 90, p. 255–264, 2014.

MONSALVE, R. I.; LU, G.; KING, T. P. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespa vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. **Protein Expression and Purification**, v. 16, n. 3, p. 410–416, 1999.

MÜLLER, U. R. Hymenoptera venom proteins and peptides for diagnosis and

treatment of venom allergic patients. **Inflammation & Allergy**, v. 10, n. 5, p. 420–428, 2011.

OLLERT, M.; BLANK, S. Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 15, n. 5, p. 15–26, 2015.

OROPEZA, A. R. et al. Patterns of anaphylaxis after diagnostic work-up: a follow-up study of 226 patients with suspected anaphylaxis. **Allergy**, v. 72, n. 12, p. 1944–1952, 2017.

OZDEMIR, C. et al. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, n. 9, p. 1226–1234, 2011.

PADAVATTAN, S. et al. Crystal structure of the major allergen from fire ant venom, Sol i 3. **Journal of Molecular Biology**, v. 383, n. 1, p. 178–185, 2008.

PALMA, M. S. Hymenoptera insect peptides. In: KASTIN, A. J. (Ed.). . **Handbook of Biologically Active Peptides**. 2. ed. San Diego: Academic press/Elsevier, 2013. p. 416–422.

PELLEQUER, J. L.; WESTHOLF, E.; REGENMORTEL, M. H. V. Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. **Methods in Enzymology**, v. 203, p. 176–201, 1991.

PEREZ-RIVEROL, A. et al. Facing Hymenoptera venom allergy: from natural to recombinant allergens. **Toxins**, v. 7, n. 7, p. 2551–2570, 2015.

PEREZ-RIVEROL, A. et al. Molecular cloning, expression and IgE-immunoreactivity of phospholipase A1, a major allergen from *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) venom. **Toxicon**, v. 124, p. 44–52, 2016.

PEREZ-RIVEROL, A. et al. Wasp venom: unravelling the toxins arsenal of *Polybia paulista* venom and its potential pharmaceutical applications. **Journal of Proteomics**, v. 161, p. 88–103, 2017.

PEREZ-RIVEROL, A. et al. Phospholipase A1-based cross-reactivity among venoms of clinically relevant Hymenoptera from Neotropical and temperate regions. **Molecular Immunology**, v. 93, p. 87–93, 2018.

PEREZ-RIVEROL, A. et al. Insect venom phospholipases A1 and A2: roles in the envenoming process and allergy. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 105, p. 10–24, 2019.

PETERS, R. S. et al. Evolutionary history of the Hymenoptera. **Current Biology**, v. 27, n. 7, p. 1013–1018, 2017.

PICKET, K. M. A new species of social wasp in the genus *Apoica* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae: Epiponini). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 105, p. 592–598, 2003.

QUIÑONES, A. E.; PEN, I. A unified model of Hymenopteran preadaptations that trigger the evolutionary transition to eusociality. **Nature Communications**, v. 8, n. 15920, p. 1–13, 2017.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 3239, p. 197–204, 2004.

SANTOS-PINTO, J. R. A. DOS et al. Silkomics: insight into the silk spinning process of spiders. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 4, p. 1179–1193, 2016.

SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. Proteomic characterization of the Hyaluronidase (E.C. 3.2.1.35) from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Protein & Peptide Letters**, v. 19, n. 6, p. 625–635, 2012.

SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. Using proteomic strategies for sequencing and post-translational modifications assignment of antigen-5, a major allergen from the venom of the social wasp *polybia paulista*. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 2, p. 855–865, 2014.

SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. B-cell linear epitopes mapping of antigen-5 allergen from *Polybia paulista* wasp venom. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 264–267, 2015.

SANTOS-PINTO, J. R. A. et al. Diversity of peptidic and proteinaceous toxins from social Hymenoptera venoms. **Toxicon**, v. 148, p. 172–196, 2018.

SANTOS, L. D. et al. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 923–937, 2007.

SCHIENER, M. et al. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 1, p. 98–108, 2017.

SCHMIDT, J. O. Clinical consequences of toxic envenomations by Hymenoptera. **Toxicon**, v. 150, p. 96–104, 2018.

SEISMANN, H. et al. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 4, p. 799–808, 2010.

SHARKEY, M. J. Phylogeny and classification of Hymenoptera. **Zootaxa**, v. 1668, p. 521–548, 2007.

SIMONS, F. E. R. et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. **World Allergy Organization Journal**, v. 7, n. 9, p. 1–19, 2014.

SOLE, D. et al. Anaphylaxis in Latin America: a report of the online Latin American survey on anaphylaxis (OLASA). **Clinics (Sao Paulo)**, v. 66, n. 6, p. 943–947, 2011.

SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Peptides from Hymenoptera venoms: biochemistry, pharmacology and potential applications in health and biotechnology. In: LIMA, M. E. et al. (Eds.). . **Animal Toxins: The State of Art. Perspectives on Health and Biotechnology**. 1. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009. p. 273–297.

SOUZA, C. L. et al. Revisiting *Polybia paulista* wasp venom using shotgun proteomics – Insights into the N-linked glycosylated venom proteins. **Journal of Proteomics**, v. 200, p. 60–73, 2019.

SPILLNER, E.; BLANK, S.; JAKOB, T. Hymenoptera allergens: from venom to “venome”. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. FEB, p. 1–7, 2014.

VAERENBERGH, M. VAN et al. Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. **Journal of Proteomics**, v. 99, p. 169–178, 2014.

VETTER, R. S. Clinical consequences of toxic envenomation by spiders. **Toxicon**, v. 152, p. 65–70, 2018.

WEBB, B.; SALI, A. Protein structure modelling with MODELLER. In: KIHARA, D. (Ed.). . **Protein Structure Prediction**. 3. ed. Nova York: Humana Press, 2014. p. 1–15.

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
ANTÍGENO 5 DO VENENO DA VESPA NEOTROPICAL *Apoica pallens*
(HYMENOPTERA, VESPIDAE)

Prof. Dr. Mario Sergio Palma
(Orientador)

Dr. Amilcar Pérez Riverol
(Coorientador)

Gabriel Hideki Izuka Moraes
(Aluno)