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

**CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO-5, ALÉRGENO
DO VENENO DA VESPA SOCIAL *Polybia paulista*
COM UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO

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

**Rio Claro
São Paulo - Brasil
Mar/2011**

JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO

**CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO-5, ALÉRGENO
DO VENENO DA VESPA SOCIAL *Polybia paulista*
COM UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Co-Orientadora: Dr^a. Lucilene Delazari dos Santos

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

**RIO CLARO
2011**

JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO

**CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO-5, ALÉRGENO
DO VENENO DA VESPA SOCIAL *Polybia paulista*
COM UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

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

Comissão Examinadora

Rio Claro, ____ de _____ de _____

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

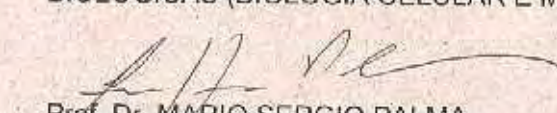
TÍTULO: Caracterização dos epítopos lineares sintéticos do alérgeno antígeno-5 do veneno da vespa social *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae)

AUTOR: JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO

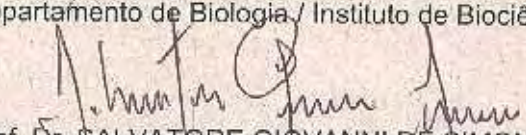
ORIENTADOR: Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS

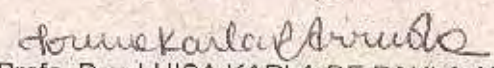
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. SALVATORE GIOVANNI DE SIMONE

Centro de Estudos Gerais / Universidade Federal Fluminense


Profa. Dra. LUISA KARLA DE PAULA ARRUDA

Depto. de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP/Ribeirão Preto

Data da realização: 03 de março de 2011.

Dedico este trabalho à minha
família e à minha *vida*.

Decidi que...
NÃO VOU MAIS:

Censurar os erros do passado...
Passarei minha vida a limpo e farei dos erros meu **aprendizado**.
Paciência... Continuarei errando, porque só erra quem faz.

Criticar ou tentar modificar alguém...
Mudarei apenas, minhas **atitudes**. Vou mudar para melhor.
Sabe por quê? Ganho eu e quem me ama também.

Abrir mão de meus sonhos...
Lutarei sempre para que eles aconteçam. Mesmo que eu tropece.
Vencerei meu **medo** e continuarei correndo atrás do melhor para mim.

Colocar minha felicidade nas mãos de alguém...
Vou ser **feliz** de qualquer jeito. De preferência, amando quem me ama,
tem preocupações comigo e torce para me ver feliz.

Ficar com pena de mim pelos meus problemas e tropeços...
Agradecerei a Deus por me fazer **forte** e por ter sobrevivido a eles.
Lembrarei sempre que dificuldade, em vez de castigo, é o maior estímulo à minha **criatividade**.

Ser pessimista e pensar no pior...
Ocuparei meu tempo com algo útil, que me divirta ou que possa ajudar alguém.
Vou esperar pelo melhor, valorizar as **amizades** e cada momento em minha vida.

Querer ser exemplo de perfeição ou copiar o dos outros...
Vou me aceitar como sou, e dar o melhor de mim em tudo que fizer.
Acima de tudo **amar** e ser amado.

Decidi que...
A partir de hoje:

Vou viver plenamente...
Poucos são os que se dispõem a abrir mão de uma vida segura, para entrar no desconhecido caminho da **autodescoberta**, aceitando ser fiéis acima de tudo à sua própria verdade.

Mas os que ousaram arriscar e se dispuseram a ir além, apesar do medo e dos obstáculos que tiveram de atravessar, certamente têm hoje a certeza de que **valeu a pena...**

Autor desconhecido (Modificado por J.R.)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Sergio Palma, por todo o conhecimento científico, pela confiança, pela paciência em compreender que cada um de nós, mesmo profissionalmente, temos um tempo diferente de amadurecimento e também por compreender que é justamente isso que caracteriza e diferencia o trabalho em equipe em um grupo de pesquisa; pelas oportunidades proporcionadas, pela amizade, pelos ensinamentos “não científicos”, pelos desabafos... por se permitir me conhecer um pouco mais e por permitir-se conhecer um pouco mais, pelas histórias... que não são poucas, e também pelas conversas sérias e “brincas” quando necessárias... e ah!!! por aquela pressão básica.

À Dr^a Lucilene Delazari dos Santos, a Lucy!!! a mãe da Maria Eduarda, a dona de casa (com o auxílio da Valdete!) a esposa e cientista, pela orientação, por todo o conhecimento científico e experimentos já realizados, por “carregarmos o piano” e também “por tocá-lo”... pode contar que sempre estaremos realizando isso juntos... com certeza vamos tirar muitas notas musicais ainda!!! pela amizade, por simplesmente ser a pessoa que você é, com seus defeitos e virtudes “escancarados”, pela compreensão e paciência em me entender e não desistir, por acreditar e torcer por mim, por me ouvir, pelas “brincas” e por demonstrar que sempre somos capazes de realizarmos o melhor de nós, mesmo diante das adversidades.

Ao Prof. Dr. Salvatore Giovanni De-Simone do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro - FIOCRUZ/RJ, por toda a colaboração e auxílio na realização deste estudo, pela atenção e por ter me recebido tão bem em seu laboratório. E ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde – PDTIS pela realização do treinamento científico em Síntese Química de Peptídeos em Micro-escala aderidos em um suporte sólido (membrana) para identificações de regiões imunogênicas, utilizando o método do SPOT-Synthesis, utilizado no desenvolvimento deste estudo.

À Dr^a Helen Andrade Arcuri, a Heleeeennnn!!! por todo o auxílio e aventuras na modelagem molecular e bioinformática estrutural, pela paciência em me ensinar, haja paciência hein!!! pela amizade, por acreditar em mim e me apoiar, pelas conversas, por gostar de conversar... e por ser essa pessoa espontânea e transparente... ANTÍGENO-5!!! mais fácil de se pronunciar.

À minha mãe Benedita, por ser o meu exemplo de caráter, perseverança, força, dignidade, fé... por tudo o que já passamos e superamos, por me apoiar e compreender a necessidade de me manter distante, por ter me ouvido muito recentemente, pelos afagos e por sempre demonstrar que mesmo diante das dificuldades, sejam elas de qualquer natureza, devemos ser persistentes e não desistirmos.

Às minhas queridas irmãs Rosimeire e Fernanda, meus cunhados José Roberto e Dirceu, e meus sobrinhos Henrique, Matheus, Bianca e Jhenifer, por todo o carinho, apoio, por torcerem por mim e por compreenderem a minha ausência e essa necessidade de busca por conhecimentos e algo melhor... amo muito vocês.

À todos do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, pelo trabalho em grupo, pelas trocas de experiências profissionais e pessoais e por não fingirmos mais "demência"... à Ana Maria, Franciele, Nathália, Marília, Danilo, Paulo e Bibiana... à Patrícia, a Paty, more!!! pela atenção, simpatia e por toda a sua espontaneidade... à Anally, por todo o apoio e trabalho realizado em equipe, pelos cursos e eventos organizados e por toda a troca de aprendizado profissional e pessoal... à Nicoli e ao Daniel pela amizade, apoio e por notarem em mim a necessidade de conversar... éh eles não são tão desligados assim!!! por me ouvirem, pela generosidade que é em dobro, por serem as pessoas que vocês são e também pelos vinhos... "coisas boas acontecem com pessoas boas", não é Nics?!... sempre acontecerá para nós o melhor que tem que ser, você sabe disso não é?! ao Lorenzo, o Donzinho! pela amizade e toda a consideração... que você tenha todas as oportunidades merecidas para mostrar todo o seu potencial!!! à Vanessa, por todo o auxílio nas questões burocráticas e administrativas, pela amizade, pelas conversas, por me ouvir e por me dizer "eu te avisei", mas aí já está tudo "ferrado"!!! pela preocupação, pela implicância... e por toda a sua simplicidade e jeito de ser.

À todos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro – FIOCRUZ/RJ, por terem me recebido tão bem, pelas conversas aleatórias, pelos almoços científicos... Tonha, Mari, Bruna, Juliana, André, ah e a Bel! eu não esqueci... ao Luiz e à Paloma, PP... por todo o auxílio na realização dos experimentos, pela "saga do conjugado"... e pela amizade.

À todos os professores, pelo conhecimento e atenção... aos técnicos e funcionários pela simpatia, atenção, e dedicação... à Suzi, Gi e Rejane, por todo o carinho e por torcerem por mim... sim eu preciso passar mais vezes na biblioteca! à Rose, Ciça, Solange... e todos os demais que não citei.

Aos meus amigos, próximos e distantes... on-line, pela amizade, por torcerem por mim, por vibrarem comigo pelas minhas conquistas e superação... à Meiri (Pandinha, Mei) sem medo de ser feliz!, Thiago (Cis), Grazi, Nathália (Nath), Thiago (Pq), Amá, Ed, Jéferson (Tesouro), Cindi (Pico)... à Fátima (Boteco do Meu Irmão), pelas nossas conversas literalmente de mesa de bar... não, não, o meu irmão não tem um boteco! à Joice (Lina), pela amizade incondicional e paciência em me ouvir... eu sou realmente chato quando quero!!! por saber o que me dizer, e por toda a sua simplicidade, sonhos e vontade de vencer... com parcimônia! à Luciana, por me ouvir e por me mostrar que o mundo realmente “dá voltas” e que sempre somos melhores do que já fomos um dia, pelo carinho e por permitir que eu possa refletir sobre a pessoa que fui e a pessoa que sou... e nada de “cara de batata”! Aos meus companheiros de república... Ives, Daniel e Fernando pela amizade, pelas conversas de mesa de bar... sempre com uma meta! pela convivência harmônica e desorganizada da casa... descobri que também posso ser desorganizado... mas nem tanto!

Ao CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e intelectual, que confiaram em mim e não desistiram.. Nunca ninguém sabe se estou louco para rir ou para chorar. Pois o meu verso tem esse quase imperceptível tremor. Não sou melhor, do mesmo modo que nunca serei menos do que ninguém. Só tenho que estar consciente das minhas escolhas e ser responsável pelos meus atos. Toda ação tem seu preço e seu prazer, reconhecer ambos os lados é ser realista. Não sei começar e parar, apenas faço. Essa é a única coragem de verdade. E então, aqui vou eu... ***muito obrigado!***

“Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou
construir um castelo ...”

Fernando Pessoa

“Se o experimento planejado não
funcionar, não se preocupe,
comece a planejar o próximo.”

Frederick Sanger

Resumo

Os venenos dos insetos da ordem Hymenoptera contêm uma variedade de proteínas alergênicas. As ferroadas desses insetos podem induzir reações alérgicas e ocasionalmente, anafilaxias fatais. Há um crescente interesse nos componentes químicos dos venenos desses insetos, sobretudo no campo da alergia e imunologia clínica. As principais reações desses venenos são as reações inflamatórias e/ou imunológicas em suas vítimas, podendo ocorrer alguns efeitos sistêmicos. Dentre os Hymenoptera sociais, os venenos de abelhas e vespas têm sido extensivamente estudados e muitos de seus componentes moleculares já foram isolados e identificados. Fosfolipase, hialuronidase, antígeno-5 e serino-protease são proteínas antigênicas de elevada massa molecular que, quando injetadas durante o ato de ferroar, iniciam uma resposta imune peculiar, sensibilizando alguns indivíduos. Porém, poucos estudos têm sido realizados para a identificação e o mapeamento dos epítomos desses alérgenos. O conhecimento sobre a interação molecular dos principais alérgenos destes venenos certamente deverá contribuir para o aperfeiçoamento dos diagnósticos de alergia, bem como para o desenvolvimento de tratamentos mais seletivos de reações alérgicas mediadas por IgE. No presente estudo identificamos e mapeamos os epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *Polybia paulista*. O antígeno-5 é conhecido como um dos principais alérgenos do veneno de Hymenoptera com massa molecular em torno de 23 kDa e função biológica desconhecida, porém muitos estudos demonstram a sua alergenidade. Tendo conhecimento da sequência primária do antígeno-5, a identificação e o mapeamento dos epítomos foram realizados através da síntese múltipla de peptídeos, utilizando as técnicas do SPOT-Synthesis, imunodeteção e método indireto do ELISA com soro de pacientes sensíveis ao veneno da vespa social *P. paulista*. Foram identificados nove epítomos lineares de células-B imunoreativos a IgG humano, e um epítomo linear de células-B imunoreativo a IgE humano. Com a modelagem molecular por homologia foi possível mapear tridimensionalmente os epítomos lineares identificados. No presente estudo relatamos pela primeira vez

em toxinas de venenos de Hymenoptera, a caracterização de um epítopo linear de células-B imunoreativo a IgE humano, destacando a menor sequência **WAKTKE** (Trp¹⁶⁵-Ala¹⁶⁶-Lys¹⁶⁷-Thr¹⁶⁸-Lys¹⁶⁹-Glu¹⁷⁰) que caracteriza tal epítopo. O mesmo está localizado na superfície da molécula, num “loop” da estrutura tridimensional do antígeno-5, o que favorece a fácil interação com a IgE. Essa sequência apresenta-se conservada entre as sequências de antígenos-5 de outras espécies de vespas já estudadas. Para o uso potencial destes epítopos em futuras aplicações de diagnóstico e imunoterapia de hipersensibilidade a venenos de vespas, há a necessidade de segurança biológica sobre as atividades farmacológicas desses epítopos na forma isolada, i.e, como peptídeos livres. Sendo assim, todos os epítopos identificados foram sintetizados como peptídeos lineares (na forma ácida) e submetidos a ensaios de atividades hemolítica, desgranuladora de mastócitos, citolítica e quimiotática contra as células de mamíferos. Nenhum dos epítopos na forma de peptídeos livres apresentou alguma atividade biológica significativa mediante os ensaios realizados. Sendo assim, esses epítopos tornam-se candidatos em potencial para o desenvolvimento de vacinas, testes de diagnósticos e imunoterapia específica contra o veneno da vespa *P. paulista*.

Palavras chave: alérgeno; antígeno-5; SPOT-Synthesis; IgE; epítopos.

Abstract

The venom insects of Hymenoptera order contain a variety of allergenic proteins. The stings of these insects can induce allergic reactions and occasionally fatal anaphylaxis. There is a growing interest in the knowledge about the chemical components of the venom of these insects, especially in the field of allergy and clinical immunology. The main reactions of these venoms are inflammation and / or the induction of immune process in the victims; sometimes systemic effects also may be observed. Among the social Hymenoptera, the venoms of bees and wasps have been extensively studied and many of their molecular components have been isolated and identified. Phospholipase, hyaluronidase, antigen-5 and serine protease are antigenic proteins of high molecular weight, which may initiate a peculiar immune response to sensitize some individuals. However, few studies have been performed for the identification and mapping of the epitopes these allergens. The knowledge about the molecular interaction of the major allergens of these venoms with IgG and/or IgE will certainly contribute for improving the diagnosis of allergy, as well as to develop more selective treatments of reactions IgE-mediated allergy. In this study we identified and mapped the linear epitopes of B-cells of the antigen-5 from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. The antigen-5 is known as one of the major allergens from Hymenoptera venoms with molecular weight around 23 kDa and unknown biological function, but many studies show its allergenicity. The aim of this study was to identify and to map the linear epitopes of B-cells of this allergen. Taking into account the knowledge the primary sequence of antigen-5, the identification and mapping of epitopes was performed by using multiple synthesis of peptides with the combination of different protocols: SPOT-Synthesis, immunoblotting and indirect method of ELISA with the sera of venom-sensitive patients. We identified nine linear epitopes for B-cells immunoreactive to human IgG, and one linear epitope for B-cells immunoreactive to human IgE. The molecular modeling of the allergic protein permitted to map the linear epitopes in the three-dimensional structures of this protein. In this study we

report for the first time in Hymenoptera venom toxins, the characterization of B-cells linear epitope immunoreactive to human IgE, highlighting the smallest sequence **WAKTKE** (Trp¹⁶⁵-Ala¹⁶⁶-Lys¹⁶⁷-Thr¹⁶⁸-Lys¹⁶⁹-Glu¹⁷⁰) which characterizes the epitope. This epitope is located on the surface of the molecule, in a loop of three-dimensional structure of the antigen-5, which favors the easy interaction with IgE. This sequence is conserved amongst the antigen-5 of other wasp species already studied. The potential use of these epitopes in future applications of diagnosis and immunotherapy of wasp venom hypersensitivity, requires the knowledge about the biological safety related to the pharmacological activities of these epitopes as free peptides. Thus, all the identified epitopes were synthesized as linear peptides (in acidic form) and assayed for hemolysis, mast cells degranulation, cytotoxicity and chemotactic activities against mammalian cells. None of the epitopes as free peptides, showed any significant activity by the results achieved. Therefore, these epitopes become potential candidates for developing vaccines, diagnostic tests and immunotherapy against *P. paulista* wasp venom.

Key words: allergen; antigen-5; SPOT-Synthesis; IgE; epitopes.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Dados estatísticos sobre o número anual de acidentes ocasionados pelas ferroadas de vespas e abelhas no estado de São Paulo. Fonte: Ministério da Saúde / Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.....	25
Figura 2: Esquema representando os dois tipos de epítomos de células-B (ABBAS et al., 2008, adaptado).....	34
Figura 3: Esquema representando a detecção dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 através do método de imunodeteção com “pool” de soros de pacientes (n=5) sensíveis ao veneno da vespa social <i>P. paulista</i>	47
Figura 4: Esquema representando a detecção de anticorpos IgG e IgE anti-epítomos do antígeno-5 em “pool” de soros de pacientes (n=5) sensíveis ao veneno da vespa <i>P. paulista</i> , através do método indireto do ELISA.....	48
Figura 5: Alinhamento múltiplo entre a sequência primária do antígeno-5 da vespa social <i>Polybia paulista</i> (VA5_POLPA) com as sequências primárias do antígeno-5 das vespas <i>Polybia scutellaris rioplatensis</i> (VA5_POLSCR), <i>Polistes gallicus</i> (VA5_POLGA), <i>Polistes annularis</i> (VA5_POLAN), <i>Polistes dominula</i> (VA5_POLDO), <i>Dolichovespula maculata</i> (VA5_DOLMA) e <i>Vespula vulgaris</i> (VA5_VESVU). As regiões de identidade mais importantes estão assinaladas em azul escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados nesse tipo de alinhamento.....	61
Figura 6: Predição da estrutura secundária do antígeno-5 do veneno da vespa social <i>P. paulista</i> obtida através do programa JNET <i>Secondary Structure Prediction</i> . As fitas- β estão demonstradas em verde, as hélices- α estão em vermelho e as estruturas aleatórias em cinza.....	62
Figura 7: Alinhamento múltiplo entre a sequência primária do antígeno-5 da vespa social <i>Polybia paulista</i> (VA5_POLPA) com as sequências primárias de outros membros da superfamília CAP (CRISP – <i>cysteine rich secretory proteins</i>), Antígeno-5 e proteínas relacionadas à patogenicidade em plantas (Pathogenesis-related – Pr 1): <i>Solenopsis richteri</i> (VA3_SOLRI), <i>Solenopsis invicta</i> (VA3_SOLIN), <i>Tityus serrulatus</i> (VA5_TITSE), <i>Pathogenesis-related protein Solanum lycopersicum</i> (PR1A_SOLLC), <i>Nicotiana tabacum Pathogenesis-related protein</i> (PR1A_TOBAC). As regiões de identidade mais importantes estão assinaladas em azul escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados nesse tipo de alinhamento.....	63
Figura 8: Biblioteca peptídica do antígeno-5 do veneno da vespa social <i>P. paulista</i> . O plano de distribuição dos aminoácidos, assim como a determinação do protocolo para a síntese da biblioteca de peptídeos da proteína foram definidos utilizando o software <i>Multipeps</i> (MOLINA et al., 1996).....	65
Figura 9: Identificação dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativos a IgG humano.....	66
Figura 10: Análise da intensidade de reatividade dos <i>spots</i> correspondentes aos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativos a IgG humano.....	66

Figura 11: Alinhamento dos <i>spots</i> mais intensamente imunoreativos a IgG humano com os <i>spots</i> adjacentes de sequência para a identificação dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i>	67
Figura 12: Identificação dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativos a IgE humano.....	68
Figura 13: Análise da sequência correspondente ao epítomo linear de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativo a IgE humano.....	70
Figura 14: Análise da intensidade de reatividade da sequência correspondente ao epítomo linear de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativo a IgE humano.....	70
Figura 15: Detecção de anticorpos IgG anti-epítomos do antígeno-5 em “pool” de soros de pacientes sensíveis ao veneno da vespa <i>P. paulista</i> , através do método indireto do ELISA.....	73
Figura 16: Detecção de anticorpos IgE anti-epítomos do antígeno-5 em “pool” de soros de pacientes sensíveis ao veneno da vespa <i>P. paulista</i> , através do método indireto do ELISA.....	74
Figura 17: Modelo molecular da estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa social <i>P. paulista</i>	77
Figura 18: Avaliação da qualidade da estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> através do diagrama de Ramachandran.....	79
Figura 19: Mapeamento tridimensional dos epítomos lineares de células-B (assinalados em amarelo) do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativos a IgG humano. A – Epítomo 1; B – Epítomo 2; C – Epítomo 3; D – Epítomo 4; E – Epítomo 5; F – Epítomo 6; G – Epítomo 7; H – Epítomo 8; I – Epítomo 9.....	82
Figura 20: Mapeamento tridimensional do epítomo linear de células-B (assinalado em amarelo) do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativo a IgE humano.....	84
Figura 21: Mapeamento tridimensional do epítomo linear de células-B (assinalado em amarelo) do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativo a IgE humano. A imagem tridimensional em diferentes posições demonstra que o epítomo está exposto na superfície do alérgeno.....	85
Figura 22: Alinhamento múltiplo entre a sequência primária do antígeno-5 da vespa social <i>Polybia paulista</i> (VA5_POLPA) com as sequências primárias do antígeno-5 das vespas <i>Polybia scutellaris rioplatensis</i> (VA5_POLSCR), <i>Polistes gallicus</i> (VA5_POLGA), <i>Polistes annularis</i> (VA5_POLAN), <i>Polistes dominula</i> (VA5_POLDO), <i>Dolichovespula maculata</i> (VA5_DOLMA) e <i>Vespula vulgaris</i> (VA5_VESVU). As regiões de identidade mais importantes estão assinaladas em azul escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados nesse tipo de alinhamento. A região do epítomo linear do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> está assinalada com asteriscos e delimitada pela área vermelha.....	88

Figura 23: Atividade hemolítica dos peptídeos correspondentes aos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social <i>P. paulista</i> e do padrão melitina, em função da concentração variando de 1.5×10^{-7} a 3.1×10^{-4} M.....	90
Figura 24: Atividade desgranuladora de mastócitos dos peptídeos correspondentes aos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social <i>P. paulista</i> e do padrão melitina, em função da concentração variando de 1.5×10^{-7} a 3.1×10^{-4} M.....	91
Figura 25: Atividade da medida da enzima lactato desidrogenase – LDH dos peptídeos correspondentes aos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social <i>P. paulista</i> e do padrão melitina, em função da concentração variando de 1.2×10^{-6} a 3.1×10^{-4} M.....	92
Figura 26: Atividade quimiotáctica dos peptídeos correspondente aos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social <i>P. paulista</i> e do padrão pronectina 1-6, em função da concentração variando de 3.9×10^{-5} a 3.1×10^{-4} M.....	93

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Valores de identidade e similaridade entre as sequências primárias do antígeno-5 das espécies de vespas já estudadas. O código de acesso refere-se aos antígenos-5 comparados com o antígeno-5 da vespa <i>P. paulista</i>	62
Tabela 2: Valores de identidade e similaridade entre as sequências primárias de alguns membros da superfamília CAP. O código de acesso refere-se aos membros da superfamília CAP comparados com o antígeno-5 da vespa <i>P. paulista</i>	64
Tabela 3: Epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativos a IgG humano.....	68
Tabela 4: Epítopo linear de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , imunoreativo a IgE humano.....	69
Tabela 5: Análises para o modelo molecular utilizando o programa Procheck.....	80
Tabela 6: Análise para o modelo molecular utilizando o programa Verify 3D e XPLOR (RMSD da Geometria Ideal).....	81

ABREVIATÖES

% - por cento	MCM-2 – Mast cell medium 2
°C - Graus Celsius	mg – Miligramas
µg – Micrograma	MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
µL – Microlitros	min – Minutos
3D – Estrutura tridimensional	mL – mililitros
Å - Angstrom	mM - milimolar
APC – Células apresentadoras de antígenos	nm – Nanômetros
CAP – CRISP, Antígeno-5 e Pathogenesis-related Pr-1	NMM - 1-methyl 2-pirrolidona
CBS – Tampão citrato	PBS – Tampão fosfato
CRISP – Cysteine rich secretory protein	PDB – Protein Data Bank
DCM – Diclorometano	PyBOP - Benzotriazole-1-yl-oxy-tris- pyrrolidino-phosphonium Hexa- fluorophosphate
DIC – Diisopropilcarbodiimida	RAST – Radioallergosorbent test
DMF – Dimetilformamida	RMN – Ressonância magnética nuclear
ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay	SH – Solução de p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminidina
Fmoc – N-9-Fluorenilmetoxicarbonil	SPFS – Síntese de peptídeos em fase sólida
HOBt - N-hydroxybenzotriazole.H ₂ O	TBS – Tampão tris
HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão	TFA – Ácido trifluoracético
IgE – Imunoglobulinas do tipo E	T-TBS – Tampão tris com twen 20
IgG – Imunoglobulinas do tipo G	v/v – Volume por volume
kDa – Kilodaltons	α – Alfa
M – Molar	β – Beta
m/v – Massa por volume	φ – Ângulo phi
MCM-1 – Mast cell medium 1	ψ – Ângulo psi

Tabela de aminoácidos

Aminoácido	Código de 1 letra	Código de 3 letras	Massa Média	Massa Monoisotópica
Glicina	G	Gly	57.02146	57.02146
Alanina	A	Ala	71.03711	71.0371
Serina	S	Ser	87.0782	87.03203
Prolina	P	Pro	97.1167	97.05276
Valina	V	Val	99.1326	99.06841
Treonina	T	Thr	101.1051	101.04768
Cisteína	C	Cis	103.1448	103.00919
Isoleucina	I	Ile	113.1595	113.08406
Leucina	L	Leu	113.1595	113.08406
Aspargina	N	Asn	114.1039	114.04293
Ácido Aspártico	D	Asp	115.0886	115.02694
Lisina	K	Lys	128.1742	128.09496
Glutamina	Q	Gln	128.1308	128.05858
Ácido Glutâmico	E	Glu	129.1155	129.04259
Metionina	M	Met	131.1986	131.04049
Histidina	H	His	137.1412	137.05891
Fenilalanina	F	Phe	147.1766	147.06841
Arginina	R	Arg	156.1876	156.10111
Tirosina	Y	Tyr	186.2133	186.07931
Triptofano	W	Trp	163.1760	163.06333

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. Os insetos da ordem Hymenoptera.....	23
2.2. Alergias aos venenos de Hymenoptera	24
2.3. Composição dos venenos de vespas.....	28
2.4. Antígeno-5.....	31
2.5. Epítomos de células-B.....	33
2.6. Peptídeos sintéticos.....	36
2.6.1. Síntese química de peptídeos.....	36
2.6.2. SPOT-Synthesis.....	38
2.7. Bioinformática estrutural.....	40
3. JUSTIFICATIVA.....	42
4. OBJETIVOS.....	43
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.1. Identificação dos epítomos lineares de células-B.....	44
5.2.Obtenção dos soros dos pacientes sensíveis ao veneno da vespa <i>Polybia paulista</i>	45
5.3. Imunodeteção.....	46
5.4. Análise dos <i>spots</i> na membrana.....	47
5.5. ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	48
5.6. Síntese química dos peptídeos imunoreativos	49
5.7. Biotinilação dos peptídeos imunoreativos.....	50
5.8. Cromatografia líquida de alta performance.....	50
5.9. Espectrometria de massas MALDI-ToF-ToF.....	51
5.10. Hemólise.....	51
5.11. Desgranulação de mastócitos.....	52
5.12. LDH – Atividade da medida da enzima lactato desidrogenase.....	54

5.13. Quimiotaxia.....	54
5.14. Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias do antígeno-5....	55
5.15. Predição da estrutura secundária do antígeno-5.....	55
5.16. Mapeamento tridimensional dos epítomos - Modelagem molecular por homologia.....	56
5.17. Métodos de análise do modelo molecular.....	56
5.18. Comparação estrutural entre o modelo molecular e o molde (RMSD da sobreposição).....	58
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
6.1. Identificação e mapeamento dos epítomos lineares de células-B.....	64
6.2. Modelo tridimensional do antígeno-5.....	76
6.3. Mapeamento tridimensional dos epítomos lineares de células-B.....	82
6.4. Ensaios de atividade biológica.....	89
7. CONCLUSÃO.....	95
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1. Introdução

Os venenos de Hymenoptera sociais são estudados para se entender melhor as alergias ocasionadas por vespas, abelhas e formigas. Sabe-se que as ferroadas desses insetos podem causar reações alérgicas e ocasionalmente, anafilaxias fatais. Em geral, os venenos desses insetos causam dores prolongadas, edema e eritema locais, consequentes de um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos da pele. A dor pode continuar por várias horas e a ardência por alguns dias. Além dessa ação local decorrente das ferroadas, em muitos casos, podem ser observadas reações alérgicas, e até mesmo anafiláticas, que algumas vezes, chegam a ser letais.

A prevalência de sensibilização de humanos aos venenos de Hymenoptera sociais foi estimada entre 9.3% e 28.5% na população mundial, o que justifica o crescente interesse no conhecimento da estrutura e função dos componentes do veneno desses insetos.

Os principais alérgenos dos venenos de vespas são fosfolipases, hialuronidases, antígenos-5 e serino-proteases. Sendo um dos quatro principais alérgenos, o antígeno-5 é membro de uma superfamília composta de proteínas ricas em resíduos de cisteína, apresentando massa molecular em torno de 23 kDa e função biológica desconhecida, embora muitos estudos demonstrem a sua alergenicidade. Trata-se de um alérgeno frequente, descrito nos venenos de 15 diferentes espécies de vespas, sendo que a similaridade entre suas sequências e suas atividades alergênicas foram amplamente estudados.

Muitos pacientes alérgicos a venenos de vespas exibem reações para mais de um veneno de vespa, o que pode ser causado pela reatividade cruzada de um ou mais alérgenos. A reatividade cruzada é devido aos alérgenos homólogos de diferentes espécies, que estimulam a produção de IgE-específica imunoreativos aos epítomos comuns presentes nesses alérgenos.

São descritos dois tipos de epítomos de células-B: o epítomo conformacional ou descontínuo e o epítomo linear ou contínuo. Os epítomos conformacionais são formados por dois ou mais diferentes trechos de epítomos da sequência primária que estão distantes uns dos outros, porém reunidos na estrutura terciária da

molécula. Portanto, o epítopo conformacional depende da estrutura tridimensional para que ocorra a interação com o anticorpo. Já os epítomos lineares são compostos por resíduos sequenciais ao longo da sequência primária. Para esses determinantes, curtas extensões de resíduos são reconhecidas.

Sabe-se que a antigenicidade dos alérgenos pode ser determinada pela estrutura de seus epítomos, os quais dependem do arranjo espacial tridimensional dos aminoácidos do alérgeno para se ligar ao anticorpo, ou seja, precisam estar localizados em uma região de superfície para estabelecer o sítio de ligação com o anticorpo. Além da acessibilidade, outros fatores podem influenciar como, a termolabilidade e características físicas e químicas dos resíduos de aminoácidos que constituem o epítopo. Dessa maneira, estudos moleculares, que levam à identificação dos epítomos imunogênicos dos alérgenos são muito relevantes, porque permitem identificar as regiões da molécula do alérgeno que interagem com os anticorpos do paciente sensibilizado.

Os epítomos têm sido sintetizados como peptídeos isolados e utilizados na constituição de testes de diagnósticos. Nos últimos anos, surgiu o interesse em tentar controlar alergias, doenças infecciosas e crescimento de determinados tumores através de vacinas constituídas por estas biomoléculas. As vacinas peptídicas possuem como vantagens o fato de serem seguras, de poderem induzir respostas bem definidas do sistema imune e de serem sintetizadas com alta reprodutibilidade e excelente grau de pureza em grandes quantidades.

Sendo assim, no presente estudo caracterizamos a estrutura tridimensional de um importante alérgeno do veneno da vespa social *Polybia paulista*, conhecido como antígeno-5, e identificamos os epítomos lineares de células-B desta proteína, o que poderá proporcionar um grande avanço na área de imunoterapia e de diagnóstico de alergia ao veneno de vespas. Tais epítomos quando sintetizados e utilizados isoladamente poderão contribuir para diagnósticos mais eficientes e num futuro próximo poderão também ser utilizados em protocolos de imunoterapia mais seguros.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Os insetos da ordem Hymenoptera

A ordem Hymenoptera é composta por aproximadamente 200.000 espécies de abelhas, vespas e formigas. A maioria desenvolveu glândulas especializadas na produção de veneno e um aparelho de ferroar, os quais podem ser utilizados tanto na caça de presas quanto em sua própria defesa (STEEN et al., 2005).

Os insetos da ordem Hymenoptera podem ser classificados em dois grupos, de acordo com sua história evolutiva: social e solitário. Baseado na biologia e comportamento desses insetos, o veneno e o aparelho de ferroar sofreram alterações ao longo dos tempos evoluindo para melhor adaptação dessas espécies (PALMA, 2006). A maioria dos Hymenoptera solitários desenvolveu um veneno especializado, principalmente para causar paralisia das presas, permitindo assim, o desenvolvimento de suas larvas em suas próprias presas.

Sob o ponto de vista funcional o aparelho de ferrão dos Hymenoptera Aculeata pode ser dividido em duas partes: a primeira é formada por uma estrutura muscular e quitinosa que possibilita a introdução do ferrão e consequentemente a injeção do veneno; a segunda é constituída por uma porção glandular que é responsável pela produção e armazenamento do veneno (SNODGRASS, 1956). O veneno é produzido por glândulas secretoras e fica armazenado no reservatório sob a forma de precursores, sendo ativados posteriormente (PALMA et al., 1994).

O número de espécies aculeadas é de aproximadamente 50 mil, das quais 10 a 15 mil são formigas, 10 mil abelhas e as demais vespas. Os Aculeata mais primitivos atualmente são representados pelos Scolioidea, vespas escavadoras que parasitam larvas de besouros e algumas espécies de vespas. As formas ancestrais dessas vespas provavelmente deram origem a três linhas evolutivas maiores de aculeados que culminaram nas abelhas, vespas e formigas (CHAUDNETTO et al., 1994).

Na literatura, são encontradas diversas propostas de divisão das vespas em superfamílias. De acordo com a proposta de Brothers e Carpenter (1993), as vespas pertencentes ao grupo dos Hymenoptera Aculeata estão divididas em três

superfamílias: Chrysidoidea, Apoidea e Vespoidea. A família Vespidae é uma subdivisão da superfamília Vespoidea, e apresenta a totalidade dos casos conhecidos de eusociabilidade em vespas, com mais de oitocentas espécies eusociais. Essa família de vespas é composta por seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, das quais três são encontradas no Brasil, as subfamílias Masarinae, Eumeninae e Polistinae. A subfamília Polistinae é representada por três tribos: Polistini, Epiponini e Mischocyttarini, sendo a tribo Epiponini constituída por vinte gêneros e 216 espécies, dentre as quais está localizada a espécie *Polybia paulista* (CHAUDNETTO et al., 1994; CASTRO et al., 2009).

A vespa social *Polybia paulista*, conhecida popularmente como “paulistinha”, é uma espécie muito agressiva que causa muitos acidentes por ferroadas todos os anos no Estado de São Paulo. Possui hábitos urbanos, os seus ninhos são fixados diretamente ao substrato, sem pedúnculo, e os favos são colocados horizontalmente, um abaixo do outro, com um envelope protetor ovóide circundando-os (RICHARDS, et al., 1951). As fundações de novos ninhos ocorrem o ano todo independente das condições climáticas.

O Brasil apresenta um dos maiores números de espécies de vespas sociais de todo o planeta (RICHARDS, 1978). Mais de quatrocentas espécies já foram descritas. As espécies brasileiras são tipicamente neotropicais, sendo seus venenos muito diferentes daqueles encontrados nas espécies de clima temperado (REISMAN et al., 1984; CASTRO et al., 2009).

2.2. Alergia aos venenos de Hymenoptera

Atualmente, os venenos dos Hymenoptera sociais são estudados para uma melhor compreensão dos processos alérgicos ocasionados por vespas, abelhas e formigas. Sabe-se que as ferroadas desses insetos podem induzir reações alérgicas e ocasionalmente, anafilaxias fatais (FERNANDEZ et al., 1992). Estima-se que entre 9.3% e 28.5% da população mundial apresenta sensibilização aos venenos desses insetos (ANTONICELLI et al., 2002), o que justifica o crescente interesse no conhecimento da estrutura e função dos componentes do veneno,

sobretudo no campo da alergia e imunologia clínica (ROSS et al., 2000; CASTRO et al., 2009).

Dados fornecidos até o ano de 2005 (Figura 1) pela Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, demonstram o aumento no número de acidentes ocasionados pelas ferroadas de vespas e abelhas no estado de São Paulo.

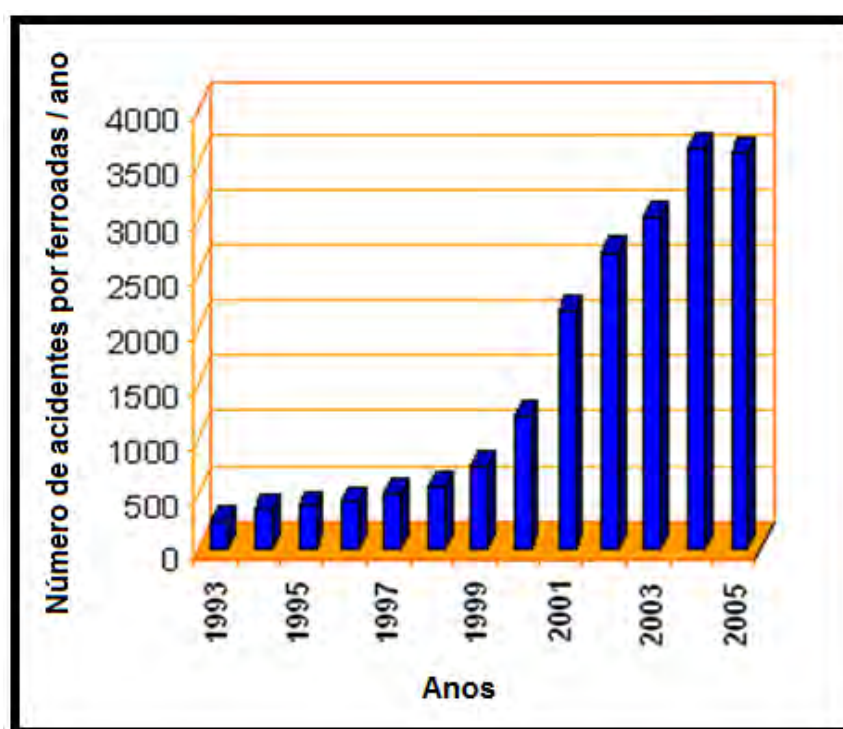


Figura 1: Dados estatísticos sobre o número anual de acidentes ocasionados pelas ferroadas de vespas e abelhas no estado de São Paulo. Fonte: Ministério da Saúde / Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.

Dados do ano de 2009 fornecidos pelo Ministério da Saúde, demonstram que foram registrados 6.445 acidentes por Hymenoptera sociais com uma incidência de 3.4/100 mil habitantes em todo o Brasil. Isso se deve não só ao aumento no número de procura por atendimentos e registros nos postos de saúde, mas também ao crescimento da urbanização e expansão rural possibilitando maior contato do homem com os ninhos desses insetos.

As reações de hipersensibilidade imediata podem provocar manifestações clínicas dos tipos local extensa e sistêmica. O mecanismo da reação envolve a produção de IgE, em resposta ao alérgeno que se liga especificamente aos receptores de IgE que por sua vez está ligado aos receptores de alta afinidade presentes nos mastócitos ocorrendo a liberação de mediadores farmacológicos como a histamina. As principais reações dos venenos dos Hymenoptera sociais são as reações inflamatórias e/ou imunológicas em suas vítimas, podendo observar a ocorrência de efeitos sistêmicos (CASTRO et al., 2009).

As reações sistêmicas de maior importância médica são aquelas que afetam os sistemas respiratório e/ou circulatório. Em geral, são caracterizadas como reações cutâneas, vasculares ou respiratórias. As reações cutâneas que afetam somente a pele se manifestam como urticária, angiodema, coceira, inchaço ou eritema. As reações vasculares envolvem o sistema circulatório, muitas vezes com queda de pressão arterial e aumento da permeabilidade vascular. Essas reações podem levar à inconsciência e desmaios. Já as reações respiratórias, consistem em inchaços ou aumento de fluídos no sistema respiratório. São caracterizadas por dificuldade de respirar, espirros, edema de glote, contração do pulmão, displasia e asma. Em pacientes sensíveis, podem ocorrer ainda, distúrbios gastrointestinais, cólicas, diarreia, náusea, vômito, incontinência, dor de cabeça, calafrio e febre (SCHMIDT, 1986; OLIVEIRA, 2000).

A maioria das reações alérgicas ocasionadas por ferroadas de vespas se deve ao desencadeamento de reações imunológicas, locais e sistêmicas. Porém, reações não alérgicas também ocorrem devido à toxicidade direta do veneno (CASTRO et al., 2009). Ocorrem vários eventos consequentes das ferroadas de vespas, tais como pruridos locais, urticária, angiodema, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais, perda de memória e tontura. As reações sistêmicas são os quadros mais agravantes, os quais envolvem hipotensão, arritmia, bronco espasmos, paradas cardíacas e respiratórias e morte do paciente (REISMAN et al., 1989; FREEMAN, 2004).

A utilização de venenos dos Hymenoptera sociais para diagnósticos e tratamento de reações alérgicas a ferroadas desses insetos foram introduzidos no

final dos anos 70 (JOHANSSON et al., 2001). Métodos de diagnósticos de alergia são extensivamente aplicados para auxiliar no tratamento de pacientes sensíveis ao veneno desses insetos. História clínica de reação sistêmica após uma ferroadada de insetos venenosos, teste de pele intradermal, sorologia para quantificação de IgE-específica e imunoterapia específica anti-IgEs são alguns dos métodos empregados (HAMILTON et al., 2004).

Os tratamentos utilizados nos processos de sensibilização de pacientes são processos de imunoterapia específica, onde pequenas doses de veneno bruto são injetadas no indivíduo alérgico. A imunidade ocorre quando há um aumento de anticorpos IgG e a diminuição de IgE no organismo do indivíduo alérgico (KING, 1996).

Estudos demonstraram que alguns pacientes sensibilizados por esses insetos não apresentaram nenhum tipo de sintoma, porém testes demonstraram a presença da IgE-específica, mostrando que os mesmos estão predispostos a desenvolver reações alérgicas em um futuro acidente (NITTNER-MARSZALSHA et al., 2004).

Atualmente, o diagnóstico de alergias e os processos de imunoterapia específicos aos venenos de Hymenoptera sociais são elaborados com extratos brutos, os quais geralmente são composições muito complexas, constituídos de um grande número de proteínas. Muitas vezes não é possível determinar a composição exata dos venenos; além disso, fatores naturais como degradação das proteínas e heterogeneidade da origem dos alérgenos, podem acarretar problemas durante os diagnósticos de alergia e processos de imunoterapia (NIEDERBERGER et al., 2004).

Os extratos comercialmente disponíveis para a realização dos testes são provenientes de outros países e, em muitas ocasiões como é o caso das vespas, diferem das espécies existentes no Brasil (PALMA et al., 1992). O desenvolvimento de extratos específicos para o tratamento de pacientes sensíveis ao veneno de vespas se faz necessário, uma vez que, podem existir proteínas no veneno que causam lesões teciduais e/ou ações farmacológicas indesejáveis, porém sem apresentar qualquer imunoreatividade. Testes realizados no Brasil

com extratos comerciais oriundos de venenos de espécies de vespas do hemisfério Norte podem levar pacientes sensibilizados a apresentarem testes cutâneos do tipo “falso-negativo” (YEE et al., 1997; ESHER et al., 2001; ANTONICELLI et al., 2002).

2.3. Composição dos venenos de vespas

Os venenos de vespas sociais são constituídos por uma mistura complexa de compostos de baixa massa molecular, peptídeos biologicamente ativos e proteínas, responsáveis pelas dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas e sistêmicas (ESHER et al., 2001; SANTOS et al., 2007). Os alérgenos encontrados nesses venenos apresentam a propriedade de induzir o sistema imune a produzir anticorpos com elevada especificidade, e, desencadear sintomas alérgicos em pacientes sensibilizados (AALBERSE, 2000).

As principais proteínas alergênicas dos venenos de vespas são fosfolipases, hialuronidases, antígenos-5 (HOFFMAN, 2006; SANTOS et al., 2007) e serino-proteases (McNAIRY et al., 2000). São proteínas antigênicas de elevada massa molecular que, quando injetadas durante o ato de ferroar, iniciam uma resposta imune peculiar, sensibilizando alguns indivíduos.

A fosfolipase hidrolisa os fosfolípidios das membranas biológicas, conduzindo à formação de poros e lise celular (DOTIMAS et al., 1987; SANTOS et al., 2007). A ação hidrolítica dessas enzimas é auxiliada pelas atividades lipásica, esterásica e fosfatásica, que atuam no processo de lise celular, destruindo-as.

Dentre os Hymenoptera, as fosfolipases foram bioquimicamente caracterizadas em *Apis mellifera* (HABERMANN et al., 1957) e em alguns venenos de vespas neotropicais (CASTRO et al., 1994; OLIVEIRA et al., 1998; COSTA et al., 2000). A fosfolipase A₁ do veneno da vespa social *Polybia paulista* foi purificado, sequenciado e caracterizado estruturalmente em estudos realizados em nosso laboratório. Essa proteína apresenta uma identidade de 53-82% com as fosfolipases de espécies de vespas do hemisfério norte já estudadas. A sua estrutura tridimensional, determinada através da modelagem molecular por homologia, demonstra que essa molécula possui 4 hélices- α (23%) e 6 folhas- β

(28%). Ainda nesse estudo foi determinado que essa proteína apresenta ação hemolítica semelhante à cardiotoxina presente no veneno da *Naja naja atra* (SANTOS et al., 2007).

A hialuronidase é uma glicoproteína de 45 kDa (KOLARICH et al., 2005), constitui um grupo de enzimas que hidrolisa o ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molecular que se localiza no interstício celular e possui a propriedade de manter a adesão celular. Pela ação da hialuronidase, o ácido hialurônico é transformado em pequenos fragmentos, diminuindo significativamente sua viscosidade e facilitando a difusão dos componentes do veneno para o interior das células (RICHES, 1982; SANTOS et al., 2010).

Nos estudos de Skov et al. (2006), a hialuronidase do veneno da vespa *Vespula vulgaris* foi bioquimicamente caracterizada sendo determinada a sua estrutura tridimensional por cristalografia de raio X, a qual apresenta 324 resíduos de aminoácidos e possivelmente de quatro a cinco sítios de glicosilação.

Descrito nos venenos de diferentes espécies de vespas sociais, o antígeno-5 é um alérgeno com função biológica desconhecida, porém, muitos estudos demonstram a sua alergenicidade. Santos et al. (2010), em estudos realizados em nosso laboratório, identificaram 6 isoformas do antígeno-5 no veneno da vespa *Polybia paulista* que se mostraram imunogênicos ao reagirem com IgE-específica presente no soro de pacientes sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*.

A serino-protease foi descrita como alérgeno sendo identificada nos venenos das vespas *Polistes dominulus*, Pol d 4, e *Polistes exclamans*, Pol e 4 com 33 kDa, e também no veneno de *Apis mellifera*, Api m 7 com 39 kDa (McNAIRY et al., 2000; WINNINGHAM et al., 2004; IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, www.uniprot.org).

A fosfatase ácida, Api m 3, foi sequenciada e caracterizada no veneno de *Apis mellifera* sendo um dos principais alérgenos com 43 kDa. Nos venenos de vespas, as fosfatases ácidas estão presentes, porém sua natureza antigênica ainda é desconhecida (HOFFMAN et al., 2005; GRUNWALD et al., 2006; IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, www.uniprot.org).

Pouco se sabe sobre proteases de venenos de vespas. Uma protease de 36.6 kDa do veneno da vespa *Polistes gallicus* isolada por cromatografia de afinidade, apresentou a sequência N-terminal IVNGVXTEINEFPXMV, onde X indica resíduos de aminoácidos com incerteza. E no veneno da vespa *Vespula vulgaris* foi encontrada uma protease com 44 kDa. Até então, somente a sequência completa de duas proteases do veneno das abelhas *Apis mellifera* (SCHMIDT et al., 2002) e *Bombus pennsylvanicus*, além de 20 resíduos do N-terminal da protease de *Bombus terrestris* (HOFFMAN et al., 2001) estão disponíveis nos bancos de proteínas alergênicas (IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, www.uniprot.org).

A análise proteômica do veneno da vespa social *Polybia paulista*, estudo realizado em nosso laboratório, revelou que além das proteínas alergênicas clássicas dos Hymenoptera, foram identificadas outras proteínas nunca descritas nesses venenos como arginina quinases, proteínas de choque térmico, tropomiosina, alfa glicosidase e superóxido dismutases (SANTOS et al., 2010).

Pacientes alérgicos a venenos de vespas podem apresentar reações para mais de um veneno de vespa, o que pode ser ocasionado pela reatividade cruzada de um ou mais alérgenos, devido à similaridade entre suas sequências primárias, uma vez que os anticorpos são produzidos contra regiões altamente conservadas (BARLOW et al., 1986; KING et al., 1996). Dessa forma, é inquestionável a importância da reatividade cruzada entre os venenos de insetos na prática clínica do alergologista, pois estas interações possuem impacto direto sobre o diagnóstico e melhor conduta terapêutica (CASTRO et al., 2009).

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

Em estudos de Castro et al. (1994) a comparação dos constituintes moleculares do veneno de *Apis mellifera* e da vespa *Polistes versicolor* demonstraram uma baixa reatividade cruzada entre os venenos destas espécies. Porém, o que chamou atenção foi a alta incidência de “falso-negativos” durante a determinação de IgE-específica para a vespa *P. versicolor*, quando utilizados extratos de venenos de vespas de clima temperados (Europa e EUA).

As proteínas fosfolipase A1, antígeno-5 e hialuronidase do veneno da vespa *Polybia paulista* demonstraram reatividade cruzada com os venenos da vespa *Agelaia pallipes pallipes* e da abelha *Apis mellifera*, sendo que o antígeno-5 se mostrou imunoreativo em todos os experimentos (SANTOS, 2006).

2.4. Antígeno-5

O antígeno-5 é um alérgeno frequente, descrito nos venenos de diferentes espécies de vespas sociais pertencentes aos gêneros *Polistes*, *Dolichovespula*, *Vespa*, *Vespula* e *Polybia* (HOFFMAN, 2006; SANTOS et al., 2010). Com exceção do gênero *Polybia*, todos os outros são gêneros pertencentes ao hemisfério Norte. Esse alérgeno é membro de uma superfamília, CAP, composta por proteínas ricas em resíduos de cisteína (**CRISP** – *cysteine rich secretory proteins*), **Antígeno-5** e proteínas relacionadas à patogenicidade em plantas (**Pathogenesis-related – Pr 1**) (GIBBS, et. al., 2008), apresenta massa molecular em torno de 23 kDa e função biológica desconhecida (KING et al., 1990).

Nos venenos de vespas sociais do hemisfério norte, a estrutura primária e os aspectos imunológicos do antígeno-5 têm sido extensivamente estudados (PIRPIGNANI et al., 2002; PANTERA et al., 2003). Esses estudos mostram que a identidade entre as sequências do antígeno-5 de vespas do mesmo gênero é de 98%, enquanto que entre as sequências de gêneros diferentes, como *Vespula* e *Polistes*, esse valor é de 57%. A sequência N-terminal desses alérgenos apresentou elevada identidade entre os antígenos-5 dos venenos de vespas já estudados (HOFFMAN, 1993).

Nos estudos de Cascone et al. (1995) e Pirpignani et al. (2002), com o veneno da vespa *Polybia scutellaris rioplatensis*, o antígeno-5 foi isolado e

caracterizado estruturalmente. Esse alérgeno apresenta 207 resíduos de aminoácidos, dos quais 8 são resíduos de cisteína formando 4 pontes de dissulfeto, massa molecular em torno de 23 kDa e ponto isoelétrico em torno de 9.

A estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa *Vespula vulgaris* foi determinada por cristalografia de raio X, revelando que a mesma apresenta estrutura secundária composta por 5 hélices- α e 4 folhas- β (HENRIKSEN et al., 2001).

Nos estudos de Santos et al. (2010), realizados em nosso laboratório, foram identificadas 6 isoformas do antígeno-5 e uma do alérgeno Sol i 3 (análogo do antígeno-5 em formigas) no veneno da vespa *P. paulista* por uma abordagem proteômica. Além disso, também foi demonstrada elevada similaridade entre o antígeno-5 de *P. paulista* e *P. scutellaris rioplatensis*. A elevada identidade entre as sequências primárias dos antígenos-5 das várias espécies de vespas sociais promove uma ampla reatividade cruzada entre as diferentes espécies. O antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista* demonstrou reatividade cruzada com os venenos da vespa *Agelaia pallipes pallipes* e da abelha *Apis mellifera* sendo imunoreativo em todos os experimentos realizados (SANTOS, 2006).

Os antígenos-5 de formigas e de vespas não exibem reatividade cruzada entre si, porém tem sido observada reatividade cruzada entre antígenos-5 de vespas com proteínas da família CAP de outros animais e plantas (KING et al., 1996; HOFFMAN, 2006). Estudos com soros de pacientes não alérgicos a venenos de vespas, utilizando testes cutâneos (RAST- *Radioallergosorbent test*), demonstraram uma reatividade cruzada entre o antígeno-5 (Dol m 5) presente no veneno da vespa *Dolichovespula maculata* e proteínas de plantas, relacionadas à defesa contra patogenicidade (PRPs) causada pelo vírus mosaico do tabaco e pelo vírus mosaico do tomate. Comparando-se as sequências primárias de Dol m 5 com aquelas das proteínas de defesa relacionadas à patogenicidade desses vírus em plantas, verificou-se que, 28% das mesmas eram conservadas. Evidentemente, ao consumir produtos a base de tomate e/ou pelo hábito de fumar, estes pacientes desenvolveram anticorpos contra as PRPs, que por sua vez

apresentaram reatividade cruzada com Dol m 5 da *Dolichovespula maculata* (KING, 1989).

Sabe-se que essa reatividade cruzada é devido aos alérgenos homólogos de diferentes espécies e organismos que estimulam a produção de IgE-específica imunoreativos aos epítomos comuns presentes nos alérgenos (HOFFMAN, 1985; CASTRO et al., 2009), o que impossibilita um diagnóstico preciso já que este é baseado na detecção da especificidade IgE-alérgeno. Sendo assim, a investigação dos epítomos de interação com a IgE em alérgenos é um passo fundamental para o conhecimento das bases moleculares da fisiopatologia das doenças alérgicas.

2.5. Epítomos de células-B

O sistema imunológico tem a capacidade de reagir e distinguir entre um número enorme de diferentes proteínas, as quais formam a mais abundante e diversificada classe de antígenos. A interação entre um anticorpo e seu antígeno ocorre de forma específica e com alta afinidade. Os anticorpos se ligam a seus antígenos correspondentes em locais específicos conhecidos como determinantes antigênicos ou epítomos (RUBINSTEIN et al., 2008).

Epítomos são regiões do antígeno que possuem aspectos físicos e químicos que favorecem o reconhecimento pelas regiões específicas dos anticorpos ou dos receptores de células-T. Portanto, são regiões do antígeno reconhecidas pelo sistema imune especificamente por meio de células-B e células-T (GOLDSBY et al., 2003).

Os epítomos de células-T são apresentados sobre a superfície de uma célula apresentadora de antígeno (APC), onde são ligados às moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade). São tipicamente peptídeos constituídos por 8 a 11 resíduos de aminoácidos que se ligam às proteínas de MHC, glicoproteínas integrais de membrana, sendo apresentados como epítomos de células-T aos receptores de células-T. Já os epítomos de células-B são reconhecidos diretamente por anticorpos inseridos nas membranas de células-B que podem reconhecer uma enorme variedade de antígenos. Não necessitam de

células apresentadoras de antígeno, possuem de 4 a 15 resíduos de aminoácidos e estão localizados na superfície da proteína (ABBAS et al., 2008).

Um antígeno pode ser reconhecido por várias células-B que se ligam a partes diferentes do antígeno. Desta forma, um antígeno grande como uma proteína, pode possuir vários epítomos, cada qual induzindo a produção de um anticorpo específico. Os antígenos são muito diversos, variando em tamanho, bem como na composição de sua sequência primária. No caso das proteínas, modificações pós traducionais como a adição de carboidratos durante a glicosilação, pode alterar a estrutura secundária (WESTWOOD et al., 2001).

A localização relativa de epítomos sobre a superfície de um antígeno exige um estudo detalhado com relação a sua estrutura, já que o epítomo deve estar exposto na superfície molecular para que ocorra a interação antígeno-anticorpo. Esta é a principal razão pela qual os epítomos de células-B são muito mais complexos do que os epítomos de células-T (ABBAS et al., 2008). Há uma série de critérios que podem afetar a posição do epítomo, como: a mobilidade molecular da região no antígeno, a natureza da sequência primária com regiões que podem formar voltas e estruturas aleatórias, e a sua condição hidrofílica (WESTWOOD et al., 2001). São descritos dois tipos de epítomos de células-B: o epítomo conformacional ou descontínuo e o epítomo linear ou contínuo (Figura 2).

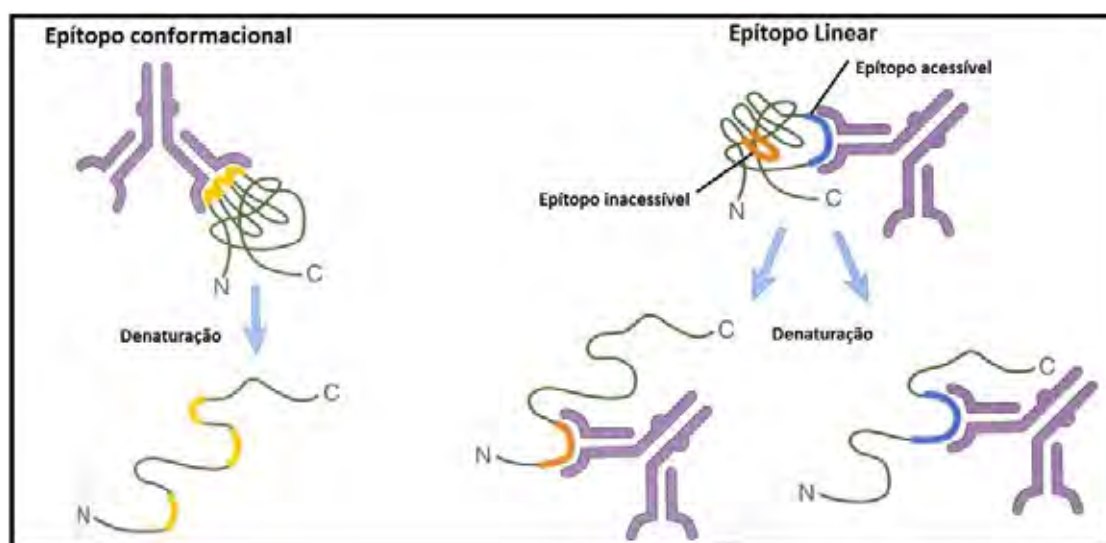


Figura 2: Esquema representando os dois tipos de epítomos de células-B (ABBAS et al., 2008, adaptado).

Epítomos conformacionais são formados por dois ou mais diferentes trechos de epítomos da sequência primária que estão distantes uns dos outros, porém reunidos na estrutura terciária da molécula. Portanto, o epítomo conformacional depende da estrutura tridimensional para que ocorra a interação com o anticorpo (BECKER & REESE, 2001). Experimentalmente, é muito difícil identificar epítomos conformacionais, uma vez que é necessária a elucidação da estrutura de interação do complexo antígeno-anticorpo por cristalografia de raio X para a identificação do epítomo.

Desde a publicação do estudo da estrutura cristalográfica do complexo lisozima-anticorpo com a identificação de três epítomos conformacionais, somente cinco estudos por cristalografia de raio X foram realizados relatando a formação do complexo alérgeno-anticorpo (Bet v 1, alérgeno do pólen; Api m 2, alérgeno hialuronidase do veneno de *Apis mellifera*; Bla g 2, alérgeno presente em baratas; β -lactoglobulina, alérgeno presente no leite; e Phl p 2, alérgeno do pólen) (MIRZA et al., 2000; PADAVATTAN et al., 2007; NIEMI et al., 2007; LI et al., 2008; PADAVATTAN et al., 2009; POMÉS, 2010).

Epítomos lineares são compostos por resíduos sequenciais ao longo da sequência primária. Para esses determinantes, curtas extensões de resíduos são reconhecidas. Na proteína nativa são inacessíveis aos anticorpos e aparecem somente quando a proteína é denaturada. No entanto, esses epítomos podem ser acessíveis na conformação nativa, enovelada, se aparecerem na superfície ou em região de conformação estendida (ABBAS, et al., 2008).

A identificação dos epítomos lineares é realizada por teste de sobreposição de peptídeos que possuem o mesmo número de aminoácidos para reação com o anticorpo IgE. Esses peptídeos são compostos de 4 a 16 aminoácidos com um deslocamento de 1 a 5 resíduos. O deslocamento é definido como a diferença entre a posição inicial de dois peptídeos consecutivos (RODDA et al., 1993; JARVINEN et al., 2007).

Os epítomos identificados podem ser sintetizados como peptídeos isolados, os quais podem ser utilizados como vacina. Esses epítomos têm sido amplamente utilizados como imunógenos e também na constituição de testes de diagnósticos

(YANG et al., 1994; WANG et al., 2003). Porém, nos últimos anos, surgiu o interesse no estudo de controle de processos alérgicos, doenças infecciosas e no crescimento de determinados tumores através de vacinas constituídas por estas biomoléculas.

Ao contrário das vacinas tradicionais, as formuladas por meio de peptídeos possuem como vantagens o fato de serem seguras, de poderem induzir respostas bem definidas do sistema imune e de serem sintetizadas com alta reprodutibilidade e excelente grau de pureza em grandes quantidades (WANG et al., 2003). Além disso, sequências podem ser selecionadas em uma proteína, eliminando assim outros segmentos potencialmente responsáveis por efeitos não desejados, conhecidos ou ainda desconhecidos devido à estimulação não específica ou indesejável.

O mapeamento de epítomos pode ser essencial em aplicações biomédicas como o desenvolvimento de vacinas, testes de diagnósticos e imunoterapia (IRVING et al., 2001). Dessa forma, uma análise detalhada da caracterização molecular dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista* pode contribuir significativamente no avanço na área de imunoterapia e de diagnóstico de doenças alérgicas. Além de ser fundamental para a compreensão dos mecanismos de ação do veneno e da base imunológica de reconhecimento molecular.

2.6. Peptídeos sintéticos

2.6.1. Síntese química de peptídeos

Os peptídeos são biomoléculas que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas numa sequência específica e possuem uma estereoquímica definida, isso determina suas propriedades específicas e a atividade biológica do produto encontrado na natureza (ALLES, 2005).

Fazem parte da estrutura das proteínas e, comparados às mesmas, são quimicamente mais versáteis, pois podem ser amidados ou esterificados em suas carboxilas terminais, acetilados em seus grupos amino terminais, fosforilados ou

sulfatados em um ou mais resíduos (serina, treonina ou tirosina), lineares, semicíclicos ou cíclicos (GUTTE, 1995). São também extremamente diversificados em termos funcionais e possuem uma ampla aplicação farmacológica. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas, antibióticos naturais, adoçantes ou substratos de proteases (KO, 2002).

A maior parte das fontes naturais é pobre nestes compostos, o que dificulta o isolamento em quantidades suficientes à realização de estudos fisiológicos, farmacológicos, bioquímicos e clínicos de grande parte dos peptídeos conhecidos. Sendo assim, tornou-se necessário sintetizar essas moléculas e análogos (derivados com modificações pontuais) em escalas variadas para a realização desses estudos.

A síntese química de peptídeos sempre foi um grande desafio para a química orgânica, tornando-se mais complexa, eficiente e amplamente utilizada (TOZZI et al, 2003). É assim denominada porque utiliza um reagente químico para ativar o ácido carboxílico de um N^α -acil-aminoácido ou N^α -acil-fragmento peptídico ($RCOOH$, componente carboxílico, doador de acila ou agente acilante), o qual sofre o ataque nucleofílico do grupo α -amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico C^α -bloqueados (H_2N-R^1 , componente amínico, receptor de acila ou agente nucleofílico) resultando na formação da ligação peptídica entre eles ($RCONHR^1$). Neste caso, os grupos funcionais reativos que não estão diretamente envolvidos na formação da ligação peptídica devem ser previamente protegidos ou bloqueados. Assim, a síntese torna-se mais controlada em relação à possível formação de subprodutos (MENDES et al, 2005).

Pode ser efetuada em solução, síntese clássica, ou na presença de um suporte polimérico, síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Na primeira, geralmente a α -carboxila do receptor de acila é esterificada ou amidada. Na SPFS, este grupo liga-se covalentemente ao suporte polimérico ou resina. A síntese clássica pode ocorrer na direção $N \rightarrow C$ -terminal ou vice-versa, enquanto que a SPFS geralmente ocorre na direção do $C \rightarrow N$ -terminal (SAKAKIBARA, 1995).

A SPFS, concebida por Merrifield em 1963 (MERRIFIELD, 1963), é a mais empregada para obtenção de peptídeos sintéticos, devido a sua praticidade, rapidez e possibilidade de automatização (LUU, et al. 1996). E estudos demonstram que a estratégia 9-Fluorenilmetiloxycarbonil/*t*-Butil (Fmoc/*t*-Butil) é uma das abordagens mais acessíveis, apresentando aplicações bem sucedidas nas rotinas de síntese de peptídeos em muitos laboratórios.

Na estratégia Fmoc, um resíduo de aminoácido ligado a uma matriz insolúvel é desprotegido para promover o acoplamento do próximo resíduo na presença de um ativador. Por exemplo, para cada ciclo da síntese, são adicionados à resina Fmoc-aminoácido-OH, HOBt (N-hidroxibenzotriazol) como agente ativador dos aminoácidos e PyBOP (benzotriazol-1-il-oxitripirrolidínio hexafluorofosfato) como agente acoplante. Além disso, para as lavagens da resina e desproteção da mesma, N-N-Dimetilformamida e Piperidina são utilizadas (MENDES et al., 2005).

Os peptídeos sintéticos são como provas inequívocas das identidades químicas e dos papéis biológicos dos peptídeos naturais. Os peptídeos biologicamente ativos estão sendo utilizados no desenvolvimento de novas drogas, pois possuem grande potencial terapêutico contra doenças infecciosas e outras enfermidades (LLOYD-WILLIAMS et al., 1997). Dessa forma, a síntese peptídica dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista* e, posteriormente a caracterização farmacológica através dos ensaios de atividade biológica, proporcionarão um grande avanço na área de imunoterapia e de diagnóstico de doenças alérgicas.

2.6.2. SPOT-Synthesis

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para a identificação de epítomos de células-B em alérgenos. A maioria das técnicas de mapeamento são baseadas no reconhecimento de anticorpos IgE através: (1) da sobreposição de peptídeos sintéticos oriundos da sequência primária do alérgeno, (2) de fragmentos do alérgeno expresso como proteína recombinante ou (3) de

alérgenos denaturados utilizando imunodeteção. Todas essas técnicas são úteis principalmente para o mapeamento de epítomos lineares (JARVINEN et al., 2007).

Novas tecnologias de microarranjo como o SPOT-Synthesis, síntese de peptídeos em ponto aderidos em um suporte sólido, proporcionaram um aprimoramento e eficiência nos métodos de síntese e, conseqüentemente, uma ampla análise de peptídeos sintéticos aderidos em suportes planares ordenados em matriz (REINEKE, 2001), mostrando-se útil nos estudos de mapeamento de epítomos lineares.

Desenvolvido por Ronald Frank e publicado em 1992, o método SPOT-Synthesis (FRANK, 1992) consiste em dispensar pequenas gotículas de derivados de aminoácidos pré-ativados, formando pontos discretos arranjados em matriz sobre uma membrana de celulose funcionalizada, onde cada ponto é individualmente acessado por distribuição automática das soluções de reagentes apropriadas. As gotículas são absorvidas e formam compartimentos individuais de reação de acordo com a estratégia Fmoc de síntese química em fase sólida (FRANK, 1992; MIN et al., 2004).

O SPOT-Synthesis sintetiza peptídeos preferencialmente com comprimentos de 12 a 18 resíduos de aminoácidos, com sobreposição das sequências cobrindo toda a sequência primária da proteína. Sendo assim, o SPOT-Synthesis surge como uma eficiente técnica proteômica nos estudos de interação molecular e identificação de peptídeos biologicamente ativos (REINEKE, 2001).

Tem sido utilizado nos estudos de interação proteína-proteína, no reconhecimento de enzima-substrato, no mapeamento de epítomos de células-T, mapeamento de parátomos, além de outras aplicações. Porém, a aplicação mais freqüente de peptídeos ordenados em matriz sintetizados pelo SPOT-Synthesis tem sido para a identificação e mapeamento de epítomos lineares de células-B na interação com anticorpos. Tendo conhecimento da sequência primária da proteína, a identificação dos epítomos se dá através do mapeamento dos peptídeos sobrepostos oriundos de bibliotecas de peptídeos da sequência protéica (REINEKE, 1999).

Epítomos lineares de células-B do MSP1a (principal proteína de superfície) da bactéria *Anaplasma marginale* do gênero *Rickettsia* que causa a doença anaplasmosose em bovinos foram mapeados através de peptídeos sobrepostos utilizando a tecnologia do SPOT-Synthesis (GARCIA-GARCIA et al., 2004). Mokfienski (2007) identificou vários epítomos lineares de células-B das principais proteínas imunogênicas do vírus vaccínia, homólogos ao vírus da varíola. Nos estudos de Lottersberger et al. (2009) foram identificadas duas regiões antigênicas de uma das variantes, LipL32, da bactéria *Leptospira spp.* causadora da doença leptospirose em humanos. E também, nos estudos de Frieder et al. (2009), epítomos de células-T do *Mycobacterium tuberculosis* foram mapeados utilizando a tecnologia do SPOT-Synthesis.

O SPOT-Synthesis tornou-se então, um método importante e eficaz nos estudos de reconhecimento molecular. Sendo assim, utilizado no presente estudo para o mapeamento dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*.

2.7. Bioinformática estrutural

A bioinformática utiliza sistemas de informações para entender processos biológicos. Trata-se de um subconjunto de um campo maior da biologia computacional, com a aplicação de técnicas analíticas quantitativas à modelagem de sistemas biológicos. Uma definição mais ampla da bioinformática seria a aplicação de ferramentas de computação para análise, captura e interpretação de dados biológicos. É uma área interdisciplinar e absorve a ciência da computação, matemática, biologia, física e medicina (BAYAT, 2002).

Um dos grandes desafios da bioinformática começa a aparecer na era pós genômica, na qual a proteômica se torna um dos principais alvos de estudo juntamente com o entendimento estrutural e funcional de proteínas. A pesquisa de proteínas em bioinformática utiliza-se de anotações de proteínas e bancos de dados de eletroforese bidimensional. Após a separação, identificação e caracterização de uma proteína, o próximo desafio na bioinformática é a predição de sua estrutura. Biólogos estruturais usam a bioinformática para manusear o

vasto e complexo conjunto de dados de cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN) para predizer modelos tridimensionais (3D) de moléculas de proteínas por modelagem molecular por homologia (BURLEY et al., 1999).

O rápido aumento no número de estruturas tridimensionais disponíveis em bancos de dados como o PDB (*Protein Data Bank*) (BERMAN et al., 2000), levou à criação de uma sub-disciplina da bioinformática: a bioinformática estrutural. O principal foco desta sub-disciplina é a representação, armazenamento, recuperação, análise e visualização da informação estrutural a níveis atômicos. Assim, a predição de estruturas tridimensionais de proteínas permanece uma área de grande interesse, sendo que a principal categoria de predições de estruturas de proteínas tem sido a modelagem molecular por homologia, baseada na alta homologia de uma sequência por uma estrutura conhecida (SANCHEZ et al., 1997).

A modelagem molecular permite, com base nos conhecimentos da estereoquímica dos aminoácidos e nas informações contidas nas estruturas terciárias resolvidas experimentalmente, prever a conformação de proteínas a partir da sequência primária de seus aminoácidos (DE LIMA, 2006), com o potencial de gerar modelos confiáveis (LESK, 2001).

A bioinformática atuando em diversas áreas, nos dá opções de análise de dados de genômica e proteômica, munindo-nos de grande quantidade de dados armazenados em bancos de dados públicos, podendo ser utilizados no cruzamento de dados, obtendo inúmeras informações relevantes ao avanço em pesquisas biológicas e tecnológicas.

3. Justificativa

Alérgenos de diferentes venenos podem apresentar semelhanças conformacionais de epítomos, tendo como consequência uma reatividade cruzada, o que impossibilita um diagnóstico preciso já que este é baseado na detecção da especificidade IgE-alérgeno. Sendo assim, a investigação da interação de epítomos de alérgenos com IgE é um passo fundamental para o conhecimento das bases moleculares da fisiopatologia das doenças alérgicas. A identificação dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista* e a caracterização farmacológica dos epítomos lineares identificados, na forma de peptídeo lineares, poderá proporcionar um grande avanço na área de imunoterapia e de diagnóstico de doenças alérgicas contra o veneno de vespas.

4. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

- Identificar os epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista*;
- Mapear tridimensionalmente os epítomos lineares de células-B do antígeno-5 identificados do veneno da vespa social *P. paulista*;
- Caracterizar farmacologicamente os epítomos lineares identificados, isolados da estrutura tridimensional, do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista*.

5. Materiais e Métodos

5.1. Identificação dos epítomos lineares de células-B

A síntese múltipla dos peptídeos em membranas de celulose (Funcionalizadas de alta estabilidade – *Intavis*) cobrindo toda a extensão do antígeno-5 foi realizada através da técnica Fmoc utilizando um sintetizador semi-automático Spot-Synthesis, modelo ASP222 (*Intavis AG – Bioanalytical Instruments*, Koeln, Alemanha) como descrito por Frank (2002). A sequência primária do antígeno-5 foi obtida em nosso laboratório nos estudos de Santos (2006), com o veneno da vespa social *P. paulista*.

O plano de distribuição dos aminoácidos, assim como a determinação do protocolo para a síntese da biblioteca de peptídeos da proteína foram definidos utilizando o software *Multipeps* (MOLINA et al., 1996). Os peptídeos foram sintetizados em tamanhos de quatorze resíduos de aminoácidos cada, com um intervalo de repetição de 3 resíduos, o que ocasionou a superposição de onze resíduos comuns entre dois peptídeos adjacentes de sequência.

O acoplamento de cada aminoácido foi realizado por duas vezes e em cada ciclo da síntese foram utilizados HOBt e DIC como agentes de acoplamento e de ativação dos aminoácidos. Este procedimento se repetiu até cobrir toda a extensão da proteína. A sequência GYPKDGNAFNNLD de *Clostridium tetani* foi utilizada como controle positivo da síntese devido a sua reatividade com IgG humano (a maioria das pessoas apresentam IgG que interage com esse fragmento peptídico) e não reatividade com IgE humano.

A membrana foi ativada através de três lavagens sucessivas por 2 min. com DMF e uma lavagem por 2 min. com etanol. Após cada ciclo, a proteção foi realizada com solução de anidrido acético (2%) em DMF e a desproteção em solução de piperidina (20%) em DMF. Esses procedimentos foram realizados manualmente e a membrana seca a temperatura ambiente antes do início de cada ciclo. A desproteção final foi realizada após o último ciclo com a membrana sendo incubada por 2 horas em solução de desproteção da cadeia lateral para membranas de alta estabilidade [2% de água Mili-Q, 3% de triisopropilsilano e 95% de TFA. Após quatro lavagens sucessivas com DCM por 30s, duas com

etanol por 2 min., duas com água Mili-Q por 2 min. e novamente duas com etanol por 2 min., a membrana foi submetida aos ensaios imunológicos. Quando não utilizada imediatamente foi acondicionada a -20°C.

5.2. Obtenção dos soros dos pacientes sensíveis ao veneno da vespa *Polybia paulista*

Para a realização dos ensaios imunológicos foram coletados soros de cinco pacientes sensíveis ao veneno da vespa social *P. paulista*, obtidos junto ao Serviço de Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina-USP. Esses soros foram retirados por venopunção dos pacientes, antes do início do tratamento com imunoterapia específica, seguindo protocolo recomendado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. As amostras foram centrifugadas a 210 g, durante 10 minutos, para separação do soro que foi aliquotado em tubos *ependorfs* e estocado em freezer a -80°, até a realização dos ensaios de Imunodeteção e do método indireto do ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Perfil dos pacientes e dos acidentes por ferroadas da vespa social *P. paulista*:

- Paciente 1 – **GR**, feminino, 23 anos, estudante, procedente de Rio Claro-SP. Paciente relatou reações após as ferroadas apresentando lesões urticariformes pelo corpo e hipotensão. Resultado do RAST: Vespa – classe 3; Formiga – classe 3; Abelha – classe 1. Teste cutâneo: resultado positivo para vespa (extrato bruto do veneno da vespa social *P. paulista*, 0.001µg/mL).
- Paciente 2 – **CMJ**, masculino, 32 anos, biólogo, procedente de São Paulo-SP. Paciente relatou reações após uma ferroada, aproximadamente dois meses antes da consulta. Apresentou tontura, turvação visual, dor de estômago, náuseas e vômitos, além de edema no local. Em segundo acidente apresentou as mesmas reações do primeiro acidente, com um quadro clínico severo, sendo encaminhado ao atendimento médico. Resultado do RAST: Vespa – classe 4; Formiga – classe 2; Abelha – classe 0. Teste cutâneo: resultado

positivo para vespa (extrato bruto do veneno da vespa social *P. paulista*, 0.001µg/mL).

- Paciente 3 – **JRL**, masculino, 42 anos, auxiliar técnico, procedente de São Paulo-SP. Paciente relatou reações após múltiplas ferroadas. Apresentou tontura, náuseas, lesões urticariformes pelo corpo e hipotensão. Resultado do RAST: Vespa – classe 3; Formiga – classe 2; Abelha – classe 2. Teste cutâneo: resultado positivo para vespa (extrato bruto do veneno da vespa social *P. paulista*, 0.001µg/mL).
- Paciente 4 – **FSJ**, masculino, 10 anos, estudante, procedente de Araras-SP. Paciente apresentou prurido generalizado, angiodema labial, náuseas e turvação visual. Já foi ferroadado por formiga, apresentando apenas edema local. Resultado do RAST: Vespa – classe 3; Formiga – classe 1; Abelha – classe 0. Teste cutâneo: resultado positivo para vespa (extrato bruto do veneno da vespa social *P. paulista*, 0.001µg/mL).
- Paciente 5 – **JRS**, masculino, 35 anos, professor, procedente de São Paulo-SP. Paciente apresentou urticária generalizada, edema labial e náuseas. Resultado do RAST: Vespa – classe 4; Formiga – classe 3; Abelha – classe 1. Teste cutâneo: resultado positivo para vespa (extrato bruto do veneno da vespa social *P. paulista*, 0.001µg/mL).

5.3. Imunodeteção

A detecção dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5, imunoreativos a IgG e IgE humano, foi realizada utilizando um “pool” de soros de pacientes (n=5) sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista* através do método de imunodeteção utilizando conjugados específicos anti-IgG e anti-IgE, conforme descrito por Hujer et al. (2004) e representado no esquema demonstrado na figura 3. A membrana foi previamente lavada com etanol por 2 min., depois, três vezes com tampão TBS por 10 min., e bloqueada por 1h 30min em solução T-TBS (0.05% (v/v) Twen 20, 3% caseína). Após duas lavagens com T-TBS (0.05% (v/v) Twen 20) por 10 min., a membrana foi incubada com anticorpo primário (“pool” de soros de pacientes

sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*) diluído 1:150 em solução T-TBS (0.05% (v/v) Twen 20, 3% caseína) por 2h. Em seguida, foi lavada três vezes com solução T-TBS (0.05% (v/v) Twen 20) por 10 min. e incubada com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (IgG de coelho anti-IgG humano) diluído 1:5000 em solução T-TBS (0.05% (v/v) Twen 20, 3% caseína) por 1h. O mesmo procedimento foi realizado durante a incubação com anticorpo secundário anti-IgE humano. Após duas lavagens sucessivas com T-TBS (0.05% (v/v) Twen 20), por 10 min. e duas com CBS por 10 min., a membrana foi incubada com substrato quimioluminescente (CPD-Star® Substrate – 0.25mM com Nitroblock - II™ para fosfatase alcalina) para ser revelada.

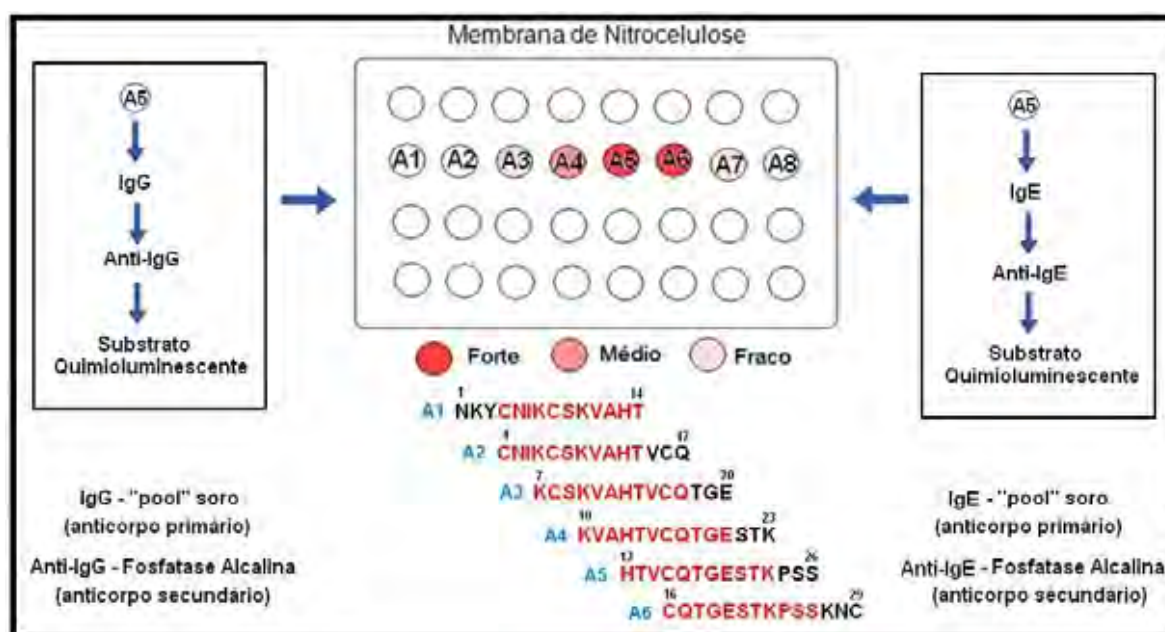


Figura 3: Esquema representando a detecção dos epítopos lineares de células-B do antígeno-5 através do método de imunodeteção com “pool” de soros de pacientes (n=5) sensíveis ao veneno da vespa social *P. paulista*.

5.4. Análise dos spots na membrana

Para a análise da reatividade dos peptídeos correspondentes aos epítopos lineares de células-B do antígeno-5, a membrana foi escaneada em um Fotodocumentador (MF ChemBis 3.2 – DNR, Bio-imaging Systems, Israel) capaz de obter imagens digitais de reações de quimioluminescência. O software TotalLab TL 100 (Nonlinear Dynamics Ltda.) foi utilizado para a análise de reatividade dos

spots. O *spot* com reatividade mais intensa na membrana foi assinalado como tendo 100% de intensidade, e todos os outros *spots* tiveram os seus valores de intensidade expressos em porcentagem relativa. Apenas os *spots* com valores densitométricos superiores a 40% de intensidade foram considerados como sendo imunoreativos.

5.5. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Para confirmar que os *spots* considerados imunoreativos durante a imunodeteção são realmente os epítomos lineares de células-B do antígeno-5, realizamos o método indireto do ELISA, um ensaio que detecta a presença de anticorpos específicos em um soro com o auxílio de uma reação enzimática (Figura 4).

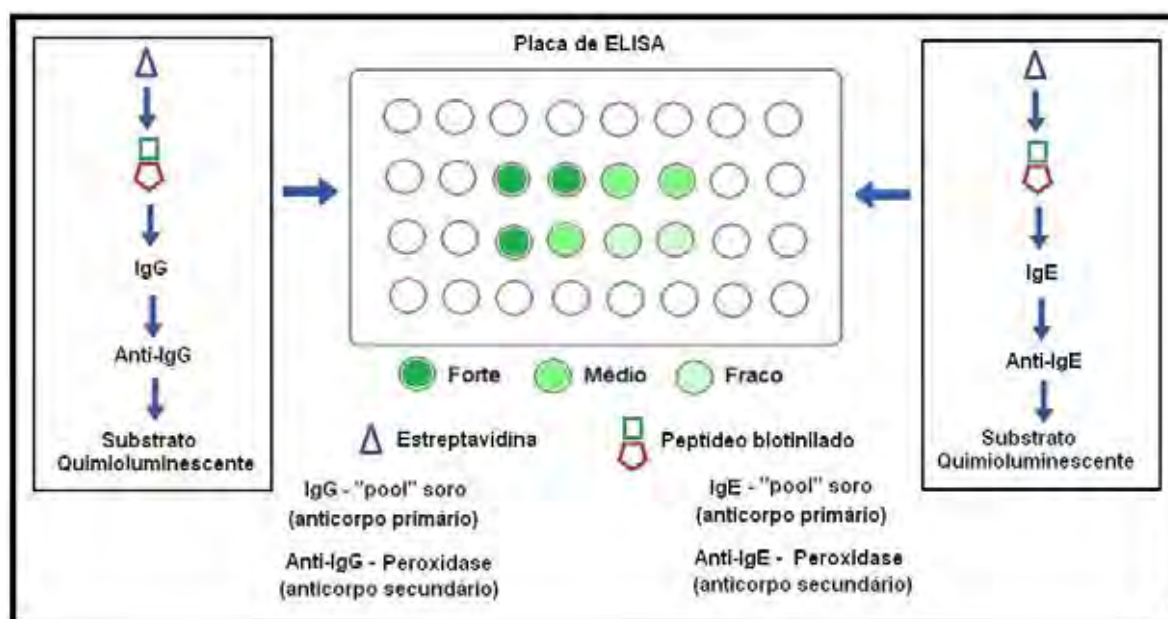


Figura 4: Esquema representando a detecção de anticorpos IgG e IgE anti-epítomos do antígeno-5 em "pool" de soros de pacientes (n=5) sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*, através do método indireto do ELISA.

Foi utilizada microplaca já contendo estreptavidina fixada em cada orifício, nos quais foram adicionados 200 ng de peptídeo biotinilado solubilizados em PBS, pH 7.4. Essa microplaca foi incubada por 16 h em uma câmara úmida a 4°C. Após esse período, a microplaca passou por um processo de lavagem com 400 µL de

solução de lavagem (PBS pH 7.4 em 0.05% (v/v) Twen 20) por três vezes. Em seguida foi adicionado 200 µL de solução de diluição (PBS pH 7.4, 0.05% (v/v) Twen 20 e 1% (m/v) caseína) em cada orifício, e novamente a microplaca foi incubada em câmara úmida por 1 h a 37°C. A microplaca foi lavada uma vez com 400 µL de solução de lavagem e incubada com anticorpo primário (“pool” de soros de pacientes (n=5) sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*) diluído 1:150 em solução de diluição por 1 h em câmara úmida a 37°C. Depois desse período a microplaca passou por um processo de lavagem com 400 µL de solução de lavagem por três vezes. Foi incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (IgG de coelho anti-IgG humano) diluído 1:5000 em solução de diluição por 1 h em câmara úmida a 37°C e depois lavada com 400 µL de solução de lavagem por cinco vezes. O mesmo procedimento foi realizado durante a incubação com anticorpo secundário anti-IgE humano. Em seguida a microplaca foi incubada com substrato para peroxidase (KPL) ABTS (2, 2'-azino-di(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonate) por 30 minutos a 25°C. Após esse período realizou-se a leitura de absorbância em um espectrofotômetro a 405 nm. Como controle da reação, foram incubados todos os reagentes juntamente com os anticorpos primário e secundário sem o peptídeo.

5.6. Síntese química dos peptídeos imunoreativos

Para a realização do método indireto do ELISA e dos ensaios de atividades biológicas, a síntese dos peptídeos correspondentes aos epítomos lineares de células-B foi realizada através do método de síntese em fase sólida, estratégia Fmoc utilizando um sintetizador automático modelo PSSM-8 (Shimadzu).

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se 15 mg de resina Fmoc-Arg (PMC)-Wang Resin com 0.54 mmole/g de grau de substituição. Essa resina foi utilizada com a finalidade de se deixar todos os peptídeos carregados positivamente tornando-os solúveis. Em cada ciclo da síntese, automaticamente foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH, contendo HOBt e NMM como agentes ativadores dos aminoácidos e PyBOP como agente acoplador. Para as lavagens

da resina e desproteção foi utilizado DMF e piperidina, respectivamente. Ao término da síntese, os frascos contendo os peptídeos foram liofilizados por 4h.

Após a secagem, foi realizada a clivagem entre o peptídeo e a resina utilizando-se uma solução de TFA 94.0% (v/v), triisopropylsilane 1% (v/v), etanoditiol 2.5% (v/v) e água ultra purificada 2.5% (v/v). Os peptídeos contendo essa solução foram incubados a 4°C por 8 h. Esta solução de clivagem contendo os peptídeos foi filtrada para retirada da resina e adicionado éter dietílico para a precipitação dos peptídeos, procedimento realizado em banho de gelo. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 2°C por 20 minutos a 630 g. Após a centrifugação, o éter foi descartado e os peptídeos ressuspensos em 1 mL de água e liofilizados para a biotinylation.

5.7. Biotinylation dos peptídeos imunoreativos

Para a realização do método indireto do ELISA, os peptídeos foram biotinilados. Dessa maneira tornou-se viável a interação do peptídeo biotinilado com a estreptavidina (proteína que possui forte afinidade por biotina) presente na microplaca e posterior interação com anticorpos IgG e IgE presentes nos soros de pacientes sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*.

Os peptídeos foram dissolvidos em água Milli-Q 80% (v/v) e tampão de biotinylation ($2\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$) 20% (v/v), perfazendo uma concentração final de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Foi preparada uma solução de biotina-NHS a 0.1 M (Kit Biotin-NHS Calbiochem) numa concentração de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em DMF. Em seguida essa solução foi adicionada em cada peptídeo já solubilizado, perfazendo 20% (v/v) final de reação. Os peptídeos foram incubados a 25°C por 1h sob leve agitação e depois liofilizados e armazenados a 4°C até a realização do ELISA.

5.8. Cromatografia líquida de alta performance

Os peptídeos foram purificados através de cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (RP-HPLC, *Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography*) utilizando um sistema de HPLC Shimadzu, modelo LC-8A, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo

SPD-20A, constituído por duas bombas LC-8A (bombas A e B), injetor Rheodyne modelo 7725i com “loop” de 2 mL, um sistema controlador Shimadzu, modelo SCL-10A e coluna preparativa C-18. Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, A (água contendo 0.1% TFA (v/v)) e B (metanol 100% contendo 0.1% TFA (v/v)) em um gradiente de 0 a 80% de solução B em um fluxo de 10 mL/min. A eluição foi monitorada por medidas de absorbância em 214, 254 e 280 nm. O controle de aquisição de dados foi realizado através do software LC Solution.

5.9. Espectrometria de massas MALDI-ToF-ToF

As análises de espectrometria de massas para a verificação da pureza e confirmação das massas de cada peptídeo sintético após a purificação foi realizada em um Espectrômetro de Massas do tipo MALDI-ToF-ToF (modelo AXIMA Performance, Shimadzu). Antes das análises experimentais, uma mistura de peptídeos calibrantes (Sigma, cod. MS-Cal 1) com massas moleculares entre 757.39, 1046.54, 1533.85, 2465.19, e 3494.65 Da foi utilizada para a calibração do espectrômetro de massas. O controle de aquisição dos dados, os quais foram adquiridos no modo Reflectron positivo em um intervalo de 500 a 3000 m/z, foi realizado através do software LaunchPad 2.8.4 (Shimadzu Biotech).

5.10. Hemólise

Todos os peptídeos correspondentes aos epítomos lineares de células-B foram testados em concentrações que variaram de 1.5×10^{-7} a 3.1×10^{-4} M em triplicata. Devido a sua atividade hemolítica, o peptídeo melitina foi utilizado como padrão.

Foram adicionados cerca de 500 µL de sangue extraído da cauda de ratos *Wistar* em 50 mL de solução salina (NaCl 0.85%, CaCl₂ 10 mM) sob leve agitação por 15 minutos para evitar a coagulação. Essa suspensão de eritrócitos foi centrifugada em presença de solução salina a 315 g por 15 minutos para a lavagem das células. Esse procedimento foi realizado por mais duas vezes, sempre descartando o sobrenadante. Após o descarte do sobrenadante da última centrifugação, o concentrado de hemácias obtido ao final foi considerado como

sendo 100% de células. Em seguida, preparou-se uma suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) diluindo a suspensão de eritrócitos concentrada com solução salina. Essa suspensão de células a 1% foi utilizada nos ensaios de atividade hemolítica.

Foram montadas baterias de ensaios em microplacas, onde cada orifício foi preenchido com diferentes concentrações de cada peptídeo, solubilizados em 10 µL de solução salina. A cada orifício foram adicionados 90 µL da suspensão de eritrócitos totalizando um volume final de 100 µL. Para o controle de 0% de hemólise, adicionou-se 10 µL de solução salina e 90 µL de suspensão de eritrócitos e para o controle de 100% de hemólise, adicionou-se 10 µL de solução salina com 1% (v/v) de Triton X-100 (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol) e 90 µL de suspensão de eritrócitos.

A microplaca foi incubada a 37°C por 2 horas sob leve agitação. Após esse período, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 315 g. Com o sobrenadante, montou-se uma nova microplaca, para realização das leituras de absorbância em uma leitora de microplacas (Modelo Biotrak II, AMERSHAM BIOSCIENCE,), com filtro de 540 nm.

5.11. Desgranulação de mastócitos

Os ensaios de desgranulação de mastócitos foram realizados utilizando o substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminidina para a enzima β-hexosaminidase, co-localizada nos grânulos de mastócitos juntamente com a histamina, que é liberada pelos mastócitos como marcador da desgranulação, sendo detectado o produto de sua hidrólise a 405 nm.

Todos os peptídeos correspondentes aos epítopos lineares de células-B foram testados em concentrações que variaram de 1.5×10^{-7} a 3.1×10^{-4} M em triplicata. Também foi utilizado o peptídeo melitina como padrão.

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução MCM-1 (*mast cell medium*) - 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 4 mM NaH₂PO₄, 3 mM KH₂PO₄, 5 mM glucose, 15 M BSA e 1 mM CaCl₂.
- Solução MCM-2 - 100 mL de solução MCM-1 e 50 µL de Lique mine (Heparina Sódica 5000 UI/0.25 mL ROCHE).

- Solução SH - 0.2 M de citrato trissódico, com pH 4.5 e 0.0034 g de p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminidina.

Os mastócitos foram coletados da cavidade peritoneal de ratos *Wistar*, os quais foram anestesiados com cloridrato xilazina 2% e cloridrato cetamina 10% e decapitados para a retirada do sangue. Através de um corte longitudinal no abdômen foi possível expor a cavidade peritoneal e realizar a lavagem da cavidade com 10 mL de solução MCM-2, para a extração do fluido contendo os mastócitos em suspensão. O fluido peritoneal foi coletado com auxílio de uma seringa e, armazenado em banho de gelo. Esse procedimento foi realizado por três vezes. O fluido peritoneal foi centrifugado a 100 g, por 5 minutos a 4°C com o sobrenadante sendo descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL da solução MCM-1. Esse procedimento foi realizado por três vezes. Após a última centrifugação, realizou-se a contagem das células em câmara de Neübauer com auxílio do corante azul de trypan, o qual indica a presença de células inviáveis (mortas), corando-as diferencialmente das células viáveis (vivas). Ao final da contagem, ajustou-se a concentração para 4.5×10^5 células/mL. Essa suspensão de células foi utilizada nos ensaios de desgranulação de mastócitos.

Foram montadas baterias de ensaios em microplacas, onde cada orifício foi preenchido com diferentes concentrações de cada peptídeo, solubilizados em 10 μ L de solução MCM-1. A cada orifício foram adicionados 90 μ L da suspensão de mastócitos totalizando um volume final de 100 μ L. Para o controle de 0% de desgranulação, adicionou-se 10 μ L de solução MCM-1 e 90 μ L de suspensão de mastócitos e para o controle de 100% de desgranulação, adicionou-se 10 μ L de solução MCM-1 com 1% (v/v) de Triton X-100 (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol) e 90 μ L de suspensão de mastócitos.

A microplaca foi incubada a 37°C por 15 minutos para que ocorresse o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Após esse período, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 100 g. Com o sobrenadante, montou-se uma nova microplaca, com cada orifício contendo 50 μ L de sobrenadante e 50 μ L de solução SH. Essa microplaca foi incubada a 37°C por 6 horas. Após a incubação, 50 μ L de cada orifício foi descartado e adicionado 150

μL de solução Tris 0.2 M a cada um deles para a realização das leituras de absorbância em uma leitora de microplacas (Modelo Biotrak II, AMERSHAM BIOSCIENCE,), com filtro de 405 nm.

5.12. LDH - Atividade da medida da enzima lactato desidrogenase

Para verificar a viabilidade dos mastócitos mediante as concentrações de 1.2×10^{-6} a 3.1×10^{-4} M dos peptídeos correspondente aos epítomos lineares de células-B, foi realizada a atividade da medida da enzima lactato desidrogenase. Essa atividade mede a liberação da lactato desidrogenase dos mastócitos, para o meio extracelular, como indicador de lise dos mastócitos pelo peptídeo. A LDH catalisa a redução reversível do piruvato a lactato com NADH como coenzima.

A atividade de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos coletada da cavidade peritoneal de ratos *Wistar*, assim como descrito para os ensaios de desgranulação. Incubou-se 20 μL do sobrenadante da suspensão de mastócitos com 800 μL de tampão UV-LDH [Reagente 1 (tris 50 mM pH 7.4, ácido pirúvico 1.2 mM, EDTA 5 mM) 80% (v/v); Reagente 2 (NADH 0.18 mM) 20% (v/v)] por 5 minutos a 25°C. Após esse período, a cinética de consumo do substrato NADH foi monitorada pela medida do decréscimo da absorbância a 340 nm, durante 12 minutos a 25°C. Os resultados foram inicialmente calculados como unidades catalíticas (micromoles de NADH consumidos por min. a 25°C, pH 7.4). Esses valores foram convertidos em atividade relativa, através da atividade de LDH total (100%) da suspensão de mastócitos lisados, na presença de 0.1% (v/v) Triton X-100.

5.13. Quimiotaxia

Os leucócitos foram coletados a partir da indução de uma inflamação subcutânea em ratos *Wistar*. Essa inflamação foi induzida através de uma micro cirurgia, introduzindo-se pedaços de esponja plástica (1 cm^3) esterilizada, na região subcutânea do dorso dos ratos. Após quatro dias, foi realizada coleta do fluido rico em leucócitos contido nas esponjas, com o auxílio de seringas de 20 mL. Esse fluido foi centrifugado em presença de solução salina [NaCl 0.9% (m/v)],

por 3 minutos a 100 g, para a retirada das hemácias que ficam sedimentadas após a centrifugação. Esse procedimento foi realizado por três vezes.

A contagem dos leucócitos foi realizada em câmara de Neübauer, ajustando a concentração para 2.1×10^5 células/mL. Essa suspensão de células foi utilizada para a realização dos ensaios de quimiotaxia. Todos os peptídeos correspondentes aos epítomos lineares de células-B foram testados em concentrações que variaram de 3.9×10^{-5} a 3.1×10^{-4} M em triplicata. O peptídeo protonectina 1-6 foi utilizado como padrão.

Para o ensaio foi utilizada uma câmara de quimiotaxia (Neuro Probe, USA) (FALK et. al., 1980) onde cada um dos orifícios da parte inferior da câmara foi preenchido com as amostras diluídas em 400 μ L de solução salina fisiológica. Uma membrana de policarbonato contendo poros de 10 μ m de diâmetro (Neuro Probe, USA) foi posicionada entre a parte inferior e a parte superior da câmara. Cada orifício da parte superior foi preenchido com 200 μ L da suspensão de leucócitos. A câmara foi incubada por 1 hora a 37°C e, após esse período realizou-se a contagem das células em câmara de Neübauer com auxílio do corante azul de trypan, o qual indica a presença de células inviáveis (mortas), corando-as diferencialmente das células viáveis (vivas). Os resultados foram expressos na forma do número de células que migraram para a parte inferior de cada um dos orifícios da câmara, em função da concentração molar de cada peptídeo.

5.14. Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias do antígeno-5

As sequências primárias foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) e editadas no programa JALVIEW (CLAMP et al., 2004). Nesse tipo de alinhamento as regiões de identidade mais importantes são assinaladas em azul escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados.

5.15. Predição da estrutura secundária do antígeno-5

A predição da estrutura secundária do antígeno-5 foi realizada através do programa JNET *Secondary Structure Prediction* (CUFF et al., 2000) e editada no

programa JALVIEW (CLAMP et al., 2004).

5.16. Mapeamento tridimensional dos epítomos - Modelagem molecular por homologia

A realização da modelagem molecular por homologia do antígeno-5 consistiu de quatro etapas: 1) Busca e seleção do molde: foi realizada uma busca no banco de dados de estruturas terciárias de proteínas, PDB (*Protein Data Bank*) por estruturas tridimensionais de antígenos-5 já resolvidas. O molde escolhido foi o da vespa social *Vespula vulgaris* (PDB: 1QNX) resolvida por cristalografia de raio X a uma resolução de 1.9 Å (HENRIKSEN, et al., 2001); 2) Alinhamento: A sequência primária do molde foi alinhada com a sequência primária do antígeno-5, para verificar a porcentagem de identidade entre eles. 3) Modelagem: o programa Modeller 9v4 foi utilizado recebendo os arquivos contendo as sequências alinhadas e as coordenadas tridimensionais do molde. Dessa forma, o programa construiu a estrutura tridimensional do antígeno-5 baseado nas coordenadas tridimensionais do molde. A imagem da estrutura tridimensional do antígeno-5 foi gerada a partir do programa PyMol (DELANO, 2002); 4) Análise: foram gerados 1000 modelos do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista* e a escolha do melhor modelo foi baseada na qualidade estereoquímica utilizando o programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1994) e a função objetiva do Modeller; o modelo do antígeno-5 foi avaliado como um todo, bem como em regiões individuais. Esta análise consistiu em estudar as posições atômicas do molde e do modelo, de modo que foi possível determinar a qualidade estereoquímica do modelo molecular do antígeno-5.

5.17. Métodos de análise do modelo molecular

- **Procheck** – o programa Procheck analisa a geometria global da estrutura ou cada resíduo individualmente, utilizando parâmetros estereoquímicos derivados de estruturas de alta resolução ou bem refinados que constituem sua base de dados. Os parâmetros estereoquímicos utilizados são aqueles descritos por Morris et al. (1992), são: ligações covalentes,

planaridade de grupos planares (aromáticos, ligações peptídicas, etc.) ângulos diédricos, quiralidade, interações não covalentes, ligações de hidrogênio da cadeia principal e pontes de dissulfeto. Os resultados são apresentados em vários arquivos diferentes, entre estes arquivos foram escolhidos o diagrama de Ramachandran e o G-factor. O diagrama de Ramachandran analisa a qualidade estereoquímica dos modelos construídos, pois representa através de um plano, a posição dos aminoácidos de acordo com os ângulos de torção ϕ e ψ formados entre o carbono- α e o nitrogênio (C α -N) e os ângulos formados entre o carbono e o carbono- α (C-C α) respectivamente. Em princípio, ϕ e ψ podem ter qualquer valores entre -180° e $+180^\circ$, porém, muitos valores dos ângulos ϕ e ψ são proibidos pelas interferências estéricas entre átomos pertencentes ao mesmo esqueleto polipeptídico e pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (GIBAS et al., 2001). O G-factor verifica os comprimentos de ligação de cadeia principal, ângulos da cadeia principal, distribuição dos ângulos Φ/ψ , distribuição dos ângulos χ_1/χ_2 e ω . Fornece uma medida do desvio de uma dada propriedade estereoquímica (ângulos de torção e geometria covalente), baseado nas distribuições observadas nos parâmetros estereoquímicos em sua base de dados e uma medida da normalidade da estrutura como um todo. O cálculo do G-factor global envolve os diversos G-factors para toda a estrutura, num único número. O G-factor global é a melhor medida da qualidade estereoquímica total de uma molécula. Por exemplo, os resíduos que caem nas regiões não permitidas do diagrama de Ramachandran terão um G-factor baixo (ou muito negativo). Se uma proteína tiver muitos resíduos com G-factor baixo sugere que algo pode estar errado com a geometria total da proteína avaliada.

- **Verify 3D** – mede a compatibilidade entre a sequência de aminoácidos de uma proteína e o modelo da sua estrutura tridimensional, usando um perfil 3D. Lüthy et al. (1992) determinaram empiricamente o índice global esperado de $Scalc = \exp(-0,83 + 1,008 \times \ln(L))$ de compatibilidade entre a sequência e a estrutura tridimensional onde L é o comprimento da sequência

e Scalc representando, então, a soma das probabilidades individuais dos resíduos. O parâmetro utilizado para escolher um modelo compatível é o limite de 45% para a confiabilidade da compatibilidade sequência/estrutura. Valores menores que 45% indicam uma estrutura incorreta, valores em torno de 45% podem estar corretas, mas possuem qualidade questionável e valores acima de 45% indicam uma estrutura correta. O resultado é uma medida da compatibilidade entre a sequência e sua estrutura 3D descrita pelo seu perfil tridimensional. O Verify 3D requer como entrada um arquivo de coordenadas atômicas no formato pdb.

- **RMSD da geometria ideal** – o desvio médio quadrático (RMSD) da geometria ideal (KEARSLEY, 1989) é calculado como uma função de todos os átomos de uma proteína, e podemos adotar a definição que o RMSD da geometria ideal serve para analisar a medida da variação da posição de cada átomo de uma estrutura com relação aos parâmetros observados por Engh et al. (1991). O RMSD da geometria ideal utiliza como parâmetros o comprimento e ângulo de ligação ideal, derivados de uma análise detalhada de estruturas de pequenas moléculas em *Cambridge Structural Database* (CSD) (ALLEN et al., 1979). O programa utilizado para executar os cálculos de comprimento e ângulos de ligação no presente estudo foi o XPLOR (SCHWIETERS et al., 2003).

5.18. Comparação estrutural entre o modelo molecular e o molde (RMSD da sobreposição)

O RMSD da sobreposição é calculado como uma função utilizando um subconjunto de átomos da proteína. Mede a diferença estrutural entre duas estruturas sobrepostas, normalmente o subconjunto de átomos escolhidos são os átomos da cadeia principal (C_{α} - C_{α}). O RMSD é uma função da distância entre os átomos em uma estrutura e os mesmos átomos em outra estrutura. Para calcular o RMSD da sobreposição as duas estruturas em consideração devem primeiro ser superpostas comparando as sequências, definindo dessa forma, as relações entre

os pares de átomos onde o RMSD da sobreposição é calculado. Uma vez definida as relações átomo-a-átomo entre as duas estruturas, obtém-se um valor de superposição ótima entre as duas estruturas, isto é, a superposição com o menor RMSD possível. Os algoritmos de superposição otimizam a orientação e a posição espacial de duas moléculas (translação e rotação) entre si. O programa utilizado para gerar essas comparações no presente estudo foi o SPDB Viewer (GUEX et al., 1997).

6. Resultados e discussão

O antígeno-5 é um alérgeno frequente, descrito nos venenos de diferentes espécies de vespas sociais. Esse alérgeno é membro de uma superfamília (CAP), apresenta massa molecular em torno de 23 kDa e função biológica desconhecida.

A sequência primária do antígeno-5 do presente estudo, apresenta 207 resíduos de aminoácidos e foi obtida em nosso laboratório nos estudos de Santos (2006) com o veneno da vespa social *P. paulista*. A sequência total foi obtida através de digestão *in gel* utilizando três enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina e protease V8). Os fragmentos peptídicos, oriundos da digestão, foram analisados por espectrometria de massas MALDI-ToF-ToF com a sequência total sendo obtida com a sobreposição das sequências parciais alinhadas. Essa sequência está depositada no banco de dados de sequências primárias NCBI *Protein Database* com o código de acesso P86686.

Na figura 5, mostramos o alinhamento das sequências primárias do antígeno-5 de venenos de 5 espécies de vespas endêmicas do hemisfério norte: *Polistes gallicus* (VA5_POLGA), *Polistes annularis* (VA5_POLAN), *Polistes dominula* (VA5_POLDO), *Dolichovespula maculata* (VA5_DOLMA), *Vespula vulgaris* (VA5_VESVU); e da espécie *Polybia scutellaris rioplatensis* (VA5_POLSCR), endêmica do hemifério sul, em comparação com o antígeno-5 da espécie endêmica da região neotropical *Polybia paulista* (VA5_POLPA). E na tabela 1, podemos comparar os valores de identidade e similaridade entre as sequências primárias dos antígenos-5 das espécies de vespas já descritas na literatura com o antígeno-5 da vespa *P. paulista*.

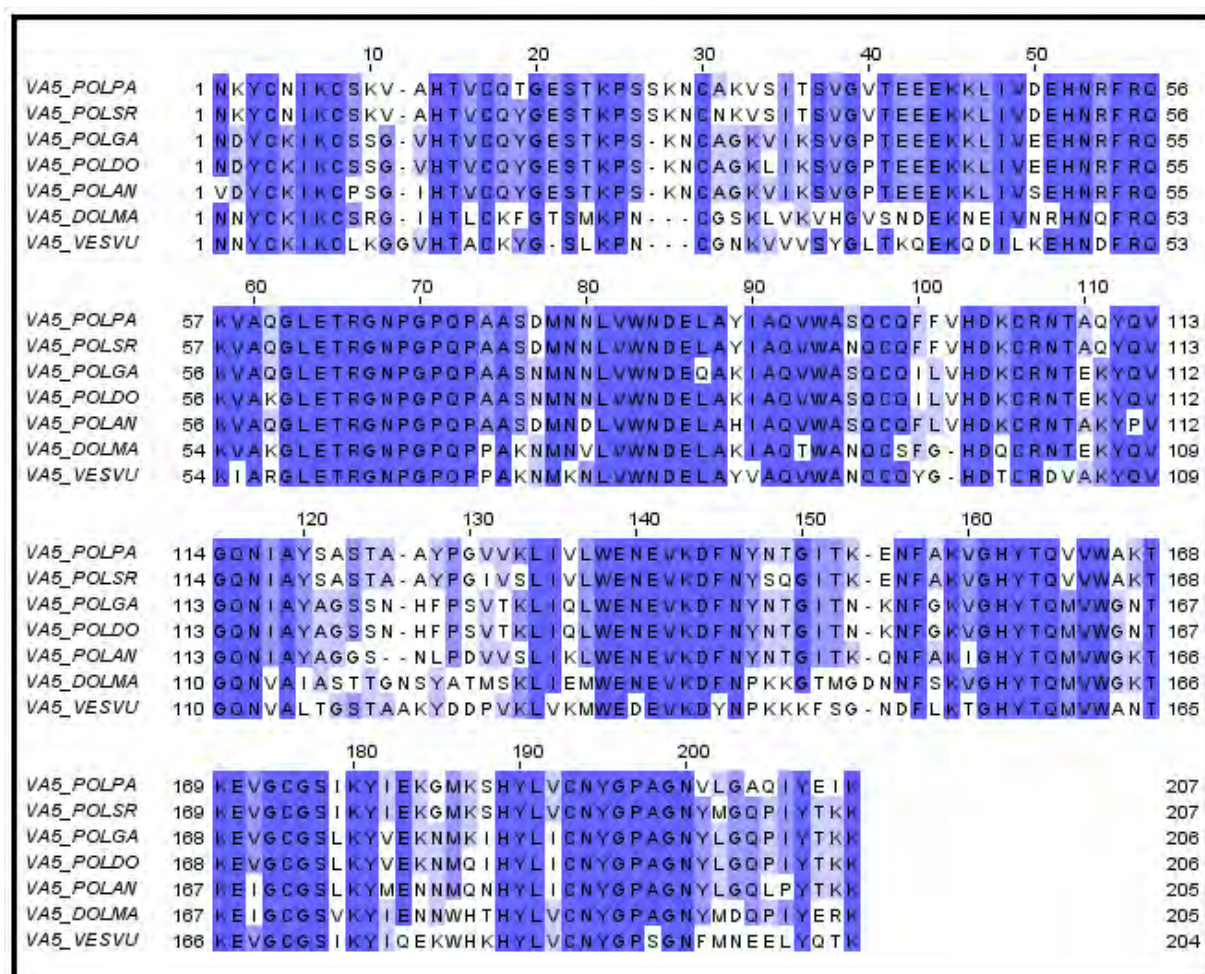


Figura 5: Alinhamento múltiplo entre a sequência primária do antígeno-5 da vespa social *Polybia paulista* (VA5_POLPA) com as sequências primárias do antígeno-5 das vespas *Polybia scutellaris rioplatensis* (VA5_POLSCR), *Polistes gallicus* (VA5_POLGA), *Polistes annularis* (VA5_POLAN), *Polistes dominula* (VA5_POLDO), *Dolichovespula maculata* (VA5_DOLMA) e *Vespa vulgaris* (VA5_VESVU). As regiões de identidade mais importantes estão assinaladas em azul escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados nesse tipo de alinhamento.

Podemos observar na figura 5, que os resíduos assinalados em azul escuro são os resíduos de aminoácidos que se conservam em todas as sequências primárias de antígenos-5 que foram alinhadas, ou seja, são os resíduos de aminoácidos idênticos em todas as sequências estudadas. Os resíduos assinalados em azul claro são os resíduos de aminoácidos que apresentam propriedades físico-químicas similares.

Tabela 1: Valores de identidade e similaridade entre as sequências primárias do antígeno-5 das espécies de vespas já estudadas. O código de acesso refere-se aos antígenos-5 comparados com o antígeno-5 da vespa *P. paulista*.

Nomenclatura (*)	Identidade (%)	Similaridade (%)	Código de Acesso
VA5_POLPA X VA5_POLSCR	93.7	96.1	Q7Z156
VA5_POLPA X VA5_POLGA	78.3	89.9	P83377
VA5_POLPA X VA5_POLAN	78.0	88.8	Q05109
VA5_POLPA X VA5_POLDO	77.8	90.3	P81656
VA5_POLPA X VA5_DOLMA	61.2	82.3	P10737
VA5_POLPA X VA5_VESVU	59.3	83.3	Q05110

* *Polybia paulista* (VA5_POLPA), *Polybia scutellaris rioplatensis* (VA5_POLSCR), *Polistes gallicus* (VA5_POLGA), *Polistes annularis* (VA5_POLAN), *Polistes dominula* (VA5_POLDO), *Dolichovespula maculata* (VA5_DOLMA), *Vespula vulgaris* (VA5_VESVU).

A tabela 1 mostra que existe uma identidade elevada entre a sequência primária do antígeno-5 da vespa *P. paulista* com as demais sequências primárias, principalmente com a sequência primária da vespa *P. scutellaris rioplatensis*, filogeneticamente pertencentes ao mesmo gênero.

Através do programa JNET *Secondary Structure Prediction* foi possível realizar a predição da estrutura secundária do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista*. Esta predição está demonstrada na figura 6, na qual podemos observar as fitas- β (coloração verde), as hélices- α (coloração vermelha) e as estruturas aleatórias (coloração cinza).

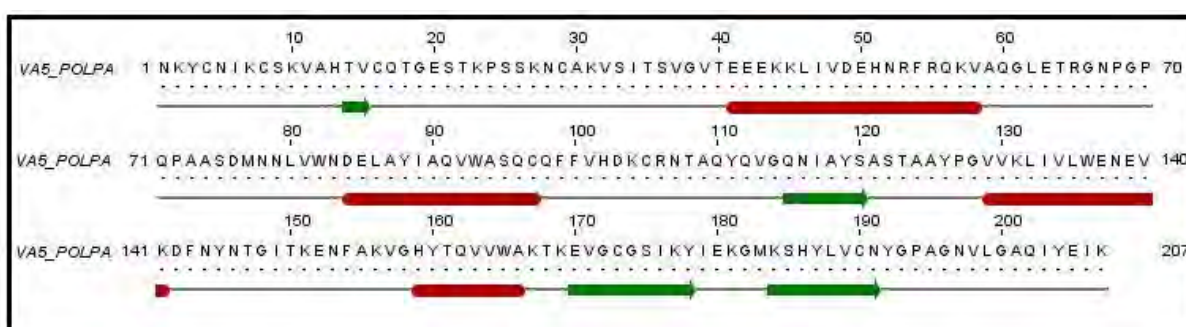


Figura 6: Predição da estrutura secundária do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista*. As fitas- β estão demonstradas em verde, as hélices- α estão em vermelho e as estruturas aleatórias em cinza.

A figura 7 mostra o alinhamento entre a sequência primária do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista* com as sequências primárias de outros membros

da superfamília CAP, e a tabela 2 mostra os valores de identidade e similaridade destas proteínas.

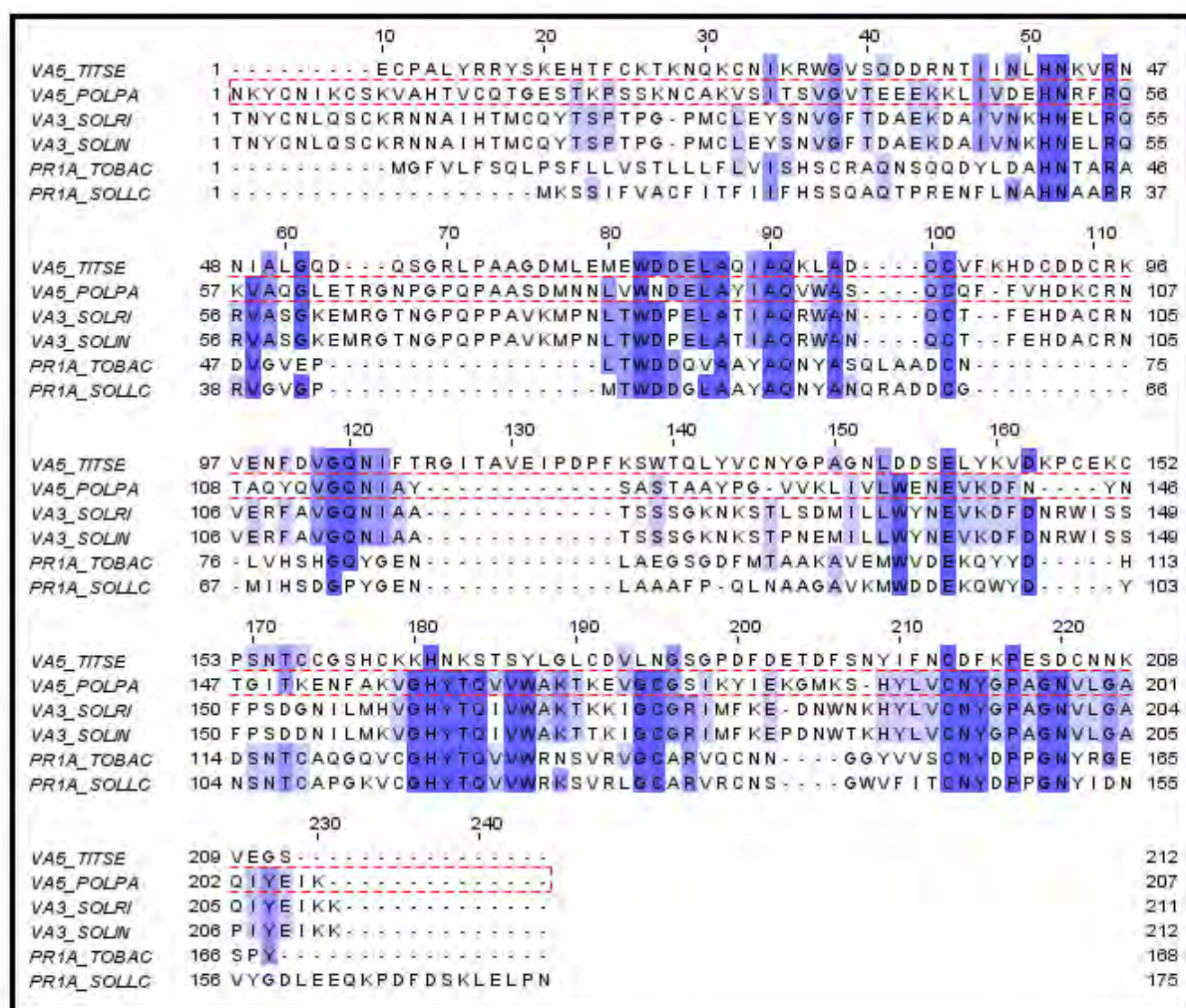


Figura 7: Alinhamento múltiplo entre a sequência primária do antígeno-5 da vespa social *Polybia paulista* (VA5_POLPA), contornado por uma linha tracejada vermelha, com as sequências primárias de outros membros da superfamília CAP: *Solenopsis richteri* (VA3_SOLRI), *Solenopsis invicta* (VA3_SOLIN), *Tityus serrulatus* (VA5_TITSE), *Pathogenesis-related protein Solanum lycopersicum* (PR1A_SOLLC), *Nicotiana tabacum Pathogenesis-related protein* (PR1A_TOBAC). As regiões de identidade mais importantes estão assinaladas em azul escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados nesse tipo de alinhamento.

Os membros da superfamília CAP são encontrados em uma enorme variedade de organismos. São proteínas frequentemente secretadas e possuem uma função parácrina ou endócrina extracelular atuando em processos como a

regulação da matriz extracelular, potencialmente como protease ou inibidor de protease, como supressor de tumor ou genes prooncogênicos em tecidos, incluindo a próstata, e na adesão celular durante a fecundação (GIBBS, et. al., 2008).

Tabela 2: Valores de identidade e similaridade entre as sequências primárias de alguns membros da superfamília CAP. O código de acesso refere-se aos membros da superfamília CAP comparados com o antígeno-5 da vespa *P. paulista*.

Nomenclatura (*)	Identidade (%)	Similaridade (%)	Código de Acesso
VA5_POLPA X VA3_SOLRI	51.6	74.0	P35779
VA5_POLPA X VA3_SOLIN	51.4	72.2	P35778
VA5_POLPA X VA5_TITSE	39.5	62.3	P85840
VA5_POLPA X PR1A_SOLLC	32.8	59.0	Q08697
VA5_POLPA X PR1A_TOBAC	29.1	56.7	P08299

* *Polybia paulista* (VA5_POLPA), *Solenopsis richteri* (VA3_SOLRI), *Solenopsis invicta* (VA3_SOLIN), *Tityus serrulatus* (VA5_TITSE), *Pathogenesis-related protein Solanum lycopersicum* (PR1A_SOLLC), *Nicotiana tabacum Pathogenesis-related protein* (PR1A_TOBAC).

6.1. Identificação e mapeamento dos epítomos lineares de células-B

Para a identificação dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5, realizamos a síntese múltipla de peptídeos em membranas de celulose cobrindo toda a extensão do alérgeno. A biblioteca peptídica (Figura 8) do antígeno-5 consistiu em um arranjo de oligopeptídeos de quatorze resíduos de aminoácidos, com superposição de onze resíduos comuns entre dois peptídeos adjacentes de sequência, sob a forma de 66 *spots* distribuídos em três linhas sobre a membrana de celulose.

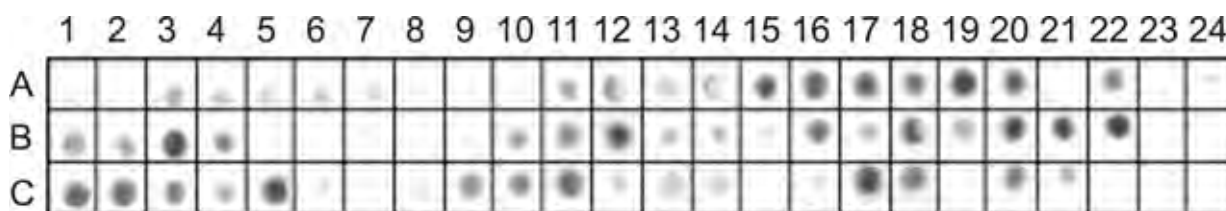


Figura 9: Identificação dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativos a IgG humano.

A IgG é um anticorpo de 150 kDa, cadeias pesadas tipo G, que perfaz 80% das imunoglobulinas do organismo. Está igualmente distribuída nos compartimentos extracelulares, sendo o anticorpo principal nas respostas imunes secundárias e a única classe antitoxinas (DE SILVA et al., 2003).

Para a análise da reatividade dos *spots* correspondentes aos epítomos imunoreativos a IgG humano, a membrana foi escaneada em um Fotodocumentador e o software TotalLab TL 100 foi utilizado para a análise da reatividade dos *spots*. O *spot* com reatividade mais intensa na membrana foi assinalado como tendo 100% de intensidade, e todos os outros *spots* tiveram os seus valores de intensidade expressos em porcentagem relativa. Apenas os *spots* com valores densitométricos superiores a 40% de intensidade foram considerados como sendo imunoreativos (Figura 10).

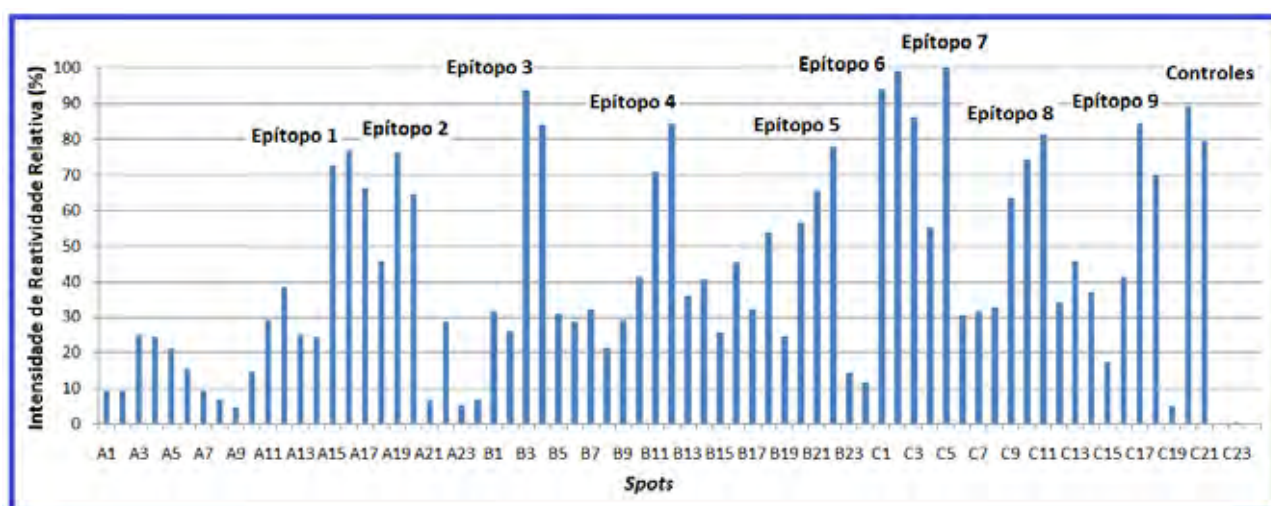


Figura 10: Análise da intensidade de reatividade dos *spots* correspondentes aos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativos a IgG humano.

Os *spots* A16, A19, B3, B12, B22, C2, C5, C11 e C17 considerados mais intensamente imunoreativos foram localizados na biblioteca peptídica e alinhados manualmente aos *spots* adjacentes de sequência para que fosse possível verificar os resíduos comuns a esses fragmentos que se mostraram imunoreativos a IgG humano (Figura 11). Após esse alinhamento foi possível identificar os fragmentos peptídicos que apresentam os epítomos lineares de células-B do antígeno-5, imunoreativos a IgG humano.

Epítopo 1		Epítopo 2	
A15 -	EKKLI VDEHNRFRQ	A19 -	RQK VAQGLET RGNP
A16 -	LIV DEHNRFRQ KVA	A20 -	VAQGLET RGNP GPQ
A17 -	DEHNRFRQ KVAQGL		
.....			
Epítopo 3		Epítopo 4	
B3 -	NLV WNDELA YIAQV	B11 -	DKC RNTAQYQ VGQN
B4 -	WNDELA YIAQVWAS	B12 -	RNTAQYQ VGQNIAY
.....			
Epítopo 5		Epítopo 6	
B20 -	VKLIV LWENE VKDF	C1 -	YNTGI TKENFA KVG
B21 -	IV LWENE VKDFNYN	C2 -	GI TKENFA KVGHYT
B22 -	WENE VKDFNYNTGI	C3 -	KENFA KVGHYTQVV
.....			
Epítopo 7		Epítopo 8	
C5 -	VGHYTQ VVWAKTKE	C10 -	GCG SIKYIE KGMKS
		C11 -	SIKYIE KGMKSHYL
.....			
Epítopo 9			
C17 -	GPA GNVLGA QIYEI		
C18 -	GNVLGA QIYEIK		

Figura 11: Alinhamento dos *spots* mais intensamente imunoreativos a IgG humano com os *spots* adjacentes de sequência para a identificação dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*.

A tabela 3 está demonstrando os fragmentos peptídicos que foram identificados como epítomos lineares de células-B imunoreativos a IgG humano, sua localização na biblioteca peptídica, posição na sequência primária e número de resíduos.

Tabela 3: Epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativos a IgG humano.

Nº	Localização na biblioteca peptídica	Fragmentos peptídicos	Posição	Nº de resíduos
1	A15-A17	VDEHNRFRQK	48-57	10
2	A19-A20	VAQGLETRGNP	58-68	11
3	B3-B4	WNDELAYIAQV	82-92	11
4	B11-B12	RNTAQYQVGQN	106-116	11
5	B20-B22	LWENEVKDFN	135-144	10
6	C1-C3	TKENFAKVGH	150-159	10
7	C5	VGHYTQVWAKTKE	157-170	14
8	C10-C11	SIKYIEKGMKS	175-185	11
9	C17-C18	GNVLGAQIYEI	196-206	11

Utilizando conjugado específico anti-IgE humano com fosfatase alcalina, o “pool” de soros de pacientes sensíveis ao veneno reagiu mais intensamente com apenas uma região do antígeno-5, identificada na figura 12.



Figura 12: Identificação dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativos a IgE humano.

A IgE é um anticorpo de 188 kDa, presente no soro em baixas concentrações, sendo encontrada na membrana de superfície de basófilos e mastócitos em todos os organismos. Pacientes com doenças alérgicas possuem altos níveis de IgE, e a específica interação entre o antígeno e a IgE ligada no mastócito resulta em liberação de mediadores como a histamina, leucotrienos e citocinas que podem produzir broncoespasmos, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e contração do músculo liso (DE SILVA et al., 2003). A IgE também é responsável pelos choques anafiláticos em seres humanos.

A tabela 4 está demonstrando o fragmento peptídico que foi identificado como epítipo linear de células-B imunoreativo a IgE humano, sua localização na biblioteca peptídica, posição na sequência primária e número de resíduos.

Tabela 4: Epítipo linear de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativo a IgE humano.

Nº	Localização na biblioteca peptídica	Fragmento peptídico	Posição	Nº de resíduos
10	C5	VGHYTQVWAKTKE	157-170	14

Os resultados obtidos demonstram que a sequência **VGHYTQVWAKTKE** mostrou-se imunoreativa tanto para a IgG quanto para a IgE humano. Isto nos levou a questionar quais eram os resíduos significativos e específicos para a caracterização de cada epítipo mediante a interação com a IgG e IgE?

Sendo assim, uma nova estratégia de síntese foi utilizada na qual a sequência **VGHYTQVWAKTKE** foi fragmentada em três partes **VGHYTQVV**, **TQVWAKTKE** e **WAKTKE**. As três partes foram sintetizadas em membrana e analisadas através do método de imunodeteção utilizando conjugado específico anti-IgE humano com fosfatase alcalina, conforme já descrito anteriormente. Optamos por fragmentar a sequência nas três partes mencionadas, a primeira constando de oito resíduos, a segunda constando de dez resíduos e a terceira constando de seis resíduos de aminoácidos, ao constatararmos que as sequências analisadas para a identificação do epítipo de número seis (Figura 11), imunoreativo a IgG, e anterior a sequência **VGHYTQVWAKTKE**, são também constituídas pelos resíduos da sequência **VGHYTQVV**. Dessa maneira, foi possível formular a hipótese de que esses oito primeiros resíduos seriam essenciais para a interação do epítipo com a IgG e que os outros seis resíduos restantes da sequência seriam essenciais para a interação do epítipo com a IgE. Os resultados dessa análise estão mostrados na figura 13, e a análise da intensidade de reatividade dos *spots* está mostrada na figura 14.

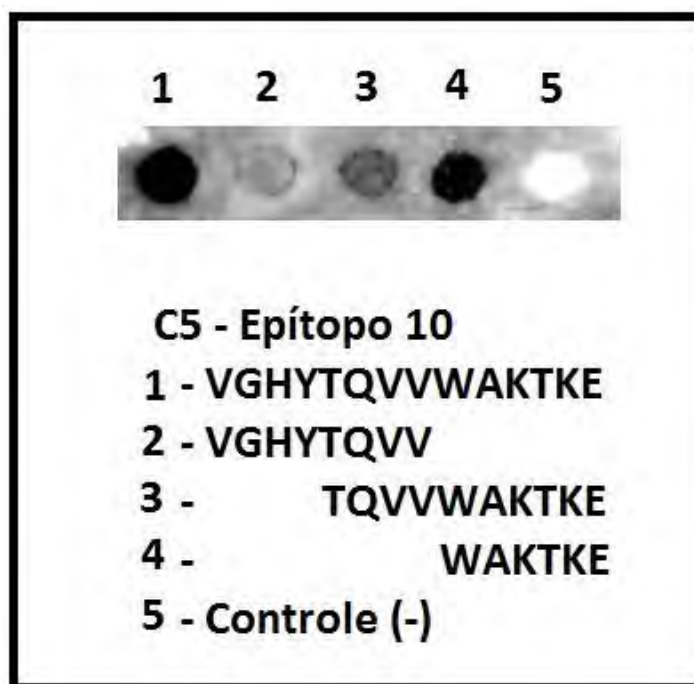


Figura 13: Análise da sequência correspondente ao epítipo linear de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativo a IgE humano.

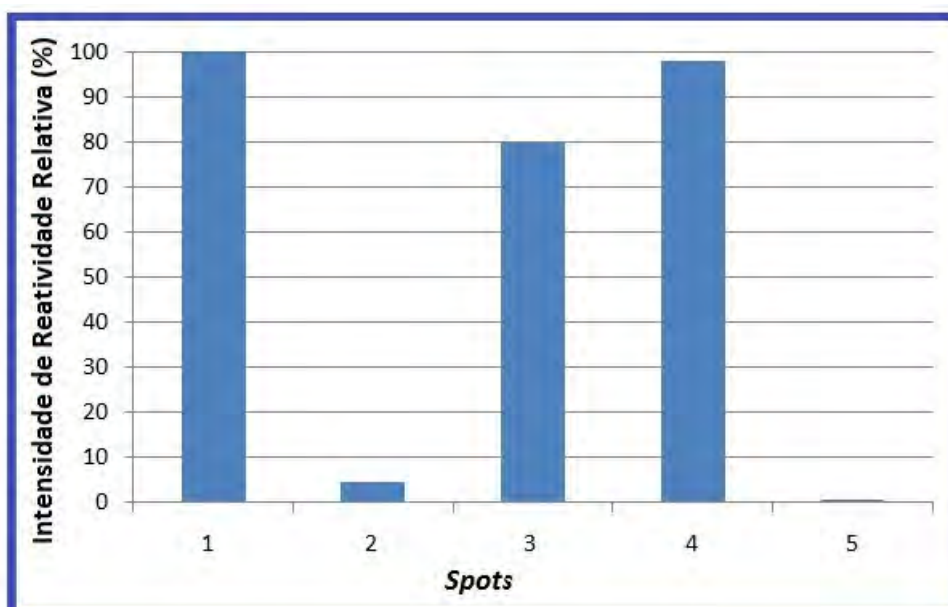


Figura 14: Análise da intensidade de reatividade da sequência correspondente ao epítipo linear de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativo a IgE humano.

Com os resultados obtidos, podemos concluir que os oito primeiros resíduos da sequência **VGHYTQVWAKTKE**, ou seja, a sequência **VGHYTQVV**, são essenciais para a interação do epítipo com a IgG e que os outros seis resíduos restantes, **WAKTKE**, confere estabilidade ao epítipo sendo essenciais para a interação com a IgE. Podemos então, chamar essa menor sequência de epítipo incompleto e a sequência toda de epítipo completo.

Os epítopos lineares são compostos por resíduos sequenciais ao longo da sequência primária. Para esses determinantes, curtas extensões de resíduos são reconhecidas. Sendo assim, podemos afirmar que conseguimos identificar a menor sequência que caracteriza o epítipo completo, **VGHYTQVWAKTKE** mediante a sua interação com a IgE humano. Ou seja, a sequência **WAKTKE** mostrou-se totalmente significativa na constituição da sequência correspondente ao epítipo linear de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*.

Os venenos de Hymenoptera sociais são estudados para uma melhor compreensão dos processos alérgicos ocasionados por vespas, abelhas e formigas. Porém, poucos estudos têm sido realizados para a identificação e o mapeamento dos epítopos dos alérgenos do veneno desses insetos.

Nos estudos de Markovic-Housley et al. (2007) foi identificado no veneno de abelha o primeiro epítipo de um dos principais alérgenos do veneno, a hialuronidase, formando um complexo específico com o fragmento *Fab* de anticorpos monoclonais anti-Hyal IgG1 (*mAb 21E11*), os quais competem com as IgE na ligação com a hialuronidase em soros de pacientes alérgicos ao veneno. O epítipo identificado é composto por uma matriz contínua de nove resíduos e se localiza na ponta de uma hélice-volta-hélice, é contínuo e sua conformação parece ser essencial para o reconhecimento do fragmento *Ab*.

O conhecimento sobre a interação molecular dos principais alérgenos desses venenos certamente deverá contribuir para o aperfeiçoamento dos diagnósticos de alergia, bem como para o desenvolvimento de tratamentos mais seletivos de reações alérgicas mediadas por IgE. Sabe-se que a reação alérgica é iniciada quando se dá a ligação do anticorpo IgE com o antígeno; esse contato resulta na liberação de mediadores farmacológicos, tais como a histamina, por

mastócitos que foram sensibilizados por IgE, produzindo uma reação inflamatória aguda. (HOLOWKA et al., 1996; MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2000).

Uma forma de se inibir o processo que desencadeia essa reação alérgica seria impedir o contato da IgE com o alérgeno, reprimindo a sensibilização dos mastócitos pela IgE. Cada antígeno pode conter um ou mais epítomos, porém somente poucos epítomos podem ativar a resposta imune, sendo denominado imunodominante (ABBAS, et al., 2008). No presente estudo, podemos afirmar que a sequência **VGHYTQVWAKTKE** corresponde ao epítomo imunodominante do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista* capaz de ativar o sistema imune.

A imunoterapia específica é a única forma de tratamento para as alergias do tipo I, porém, doses elevadas de veneno neste tratamento podem provocar anafilaxia e até mesmo morte do indivíduo alérgico (CASTRO, 2001; CASTRO et al., 2009). Uma maneira de se diminuir o risco de anafilaxia durante a imunoterapia específica é a utilização de alérgenos modificados, de uma forma que diminua ou reduza a sua interação com a IgE (JUTEL et al., 2006). Outra possibilidade é a preparação de alérgenos geneticamente modificados ou derivados alergênicos de peptídeos com atividade alergênica reduzida que induzirá uma interação específica do alérgeno com anticorpos IgG, os quais competirão com a IgE (LINHART et al., 2005).

Nas estratégias de imunoterapia, a inoculação de extratos do veneno bruto é uma estratégia de fácil manipulação, porém, apresenta efeitos colaterais indesejados; a utilização de alérgenos recombinantes através dos métodos de clonagem e expressão, possibilita apenas a produção do alérgeno de interesse obtendo os efeitos desejados com relação a imunoterapia, todavia, modificações pós-traducionais podem ocorrer durante a clonagem e expressão do alérgeno de interesse, fazendo com que o mesmo perca sua imunogenicidade.

Já a imunoterapia utilizando epítomos, apresenta a vantagem de ser altamente específica não apresentando efeitos colaterais, já que, os epítomos identificados podem ser sintetizados isoladamente do alérgeno, eliminando assim os outros segmentos potencialmente responsáveis por efeitos não desejados, conhecidos ou ainda desconhecidos devido à estimulação não específica. A

desvantagem com relação a essa estratégia é devido aos altos custos das técnicas biotecnológicas utilizadas e a necessidade de se dominar a metodologia de síntese química.

Sabe-se que os sintéticos empregados como potenciais candidatos de vacinas geralmente correspondem a fragmentos derivados de epítomos de proteínas antigênicas específicas, e que ao contrário das vacinas tradicionais, as peptídicas possuem como vantagens o fato de serem seguras, de poderem induzir respostas bem definidas do sistema imune e de serem sintetizadas com alta reprodutibilidade e excelente grau de pureza em grandes quantidades (WANG et al., 2003).

Para confirmar que os *spots* considerados imunoreativos durante a imunodeteção são realmente os epítomos lineares de células-B do antígeno-5, realizamos o método indireto do ELISA permitindo uma análise quantitativa (Figuras 15 e 16).

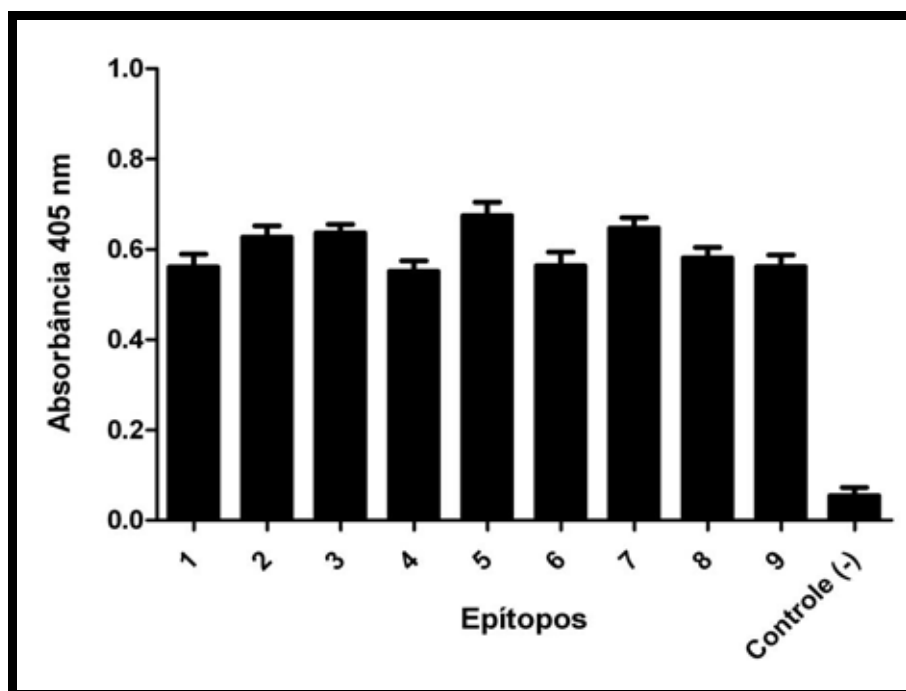


Figura 15: Detecção de anticorpos IgG anti-epítomos do antígeno-5 em “pool” de soros de pacientes sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*, através do método indireto do ELISA.

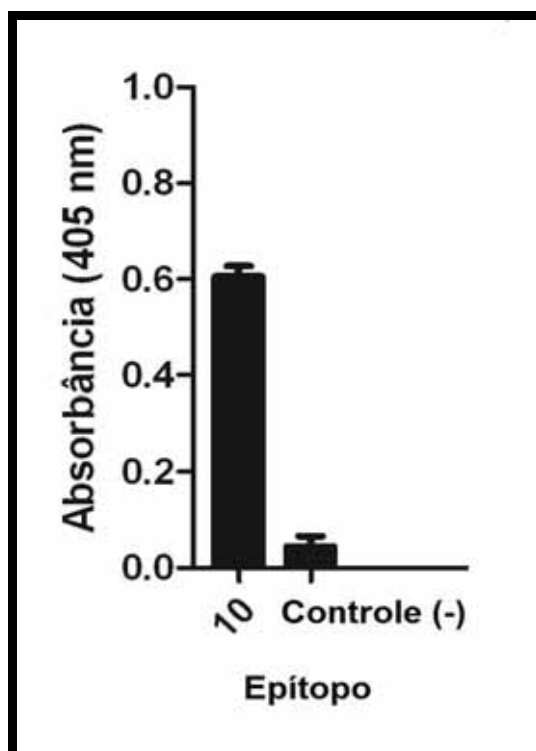


Figura 16: Detecção de anticorpos IgE anti-epítipos do antígeno-5 em “pool” de soros de pacientes sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*, através do método indireto do ELISA.

Os resultados do ELISA demonstram que os peptídeos considerados imunoreativos durante a imunodetecção são realmente os epítipos lineares de células-B do antígeno-5, ao detectar a interação dos mesmos com os anticorpos IgG e IgE presentes no “pool” de soros de pacientes sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*.

Embora a função biológica do antígeno-5 seja ainda desconhecida, muitos estudos demonstram a sua alergenicidade. São as proteínas mais abundantes nos venenos de vespas frequentemente associadas a respostas alérgicas em seres humanos (BOHLE et. al., 2005). Devido à diversidade evolutiva das proteínas pertencentes à superfamília CAP, várias relações funcionais foram propostas para essas proteínas, como a regulação do sistema imune (GIBBS, et. al., 2008). O antígeno-5, inicialmente identificado em formigas e vespas, forma uma clade distinta dentro dessa superfamília. Posteriormente também identificado no

intestino médio de *Drosophila* (KOVALICK et. al., 1998), e secretado na saliva de carrapatos (MANS et. al., 2008), flebotomíneos (CHARLAB et. al., 1999) e mosquitos (CALVO et. al., 2007).

Em carrapatos, moscas e mosquitos (MANS et. al., 2008; VALENZUELA et. al., 2002), o antígeno-5 compõe um coquetel de proteínas salivares, as quais teriam a função de supressão do sistema imune do hospedeiro ou a prevenção da coagulação, com a finalidade de se prolongar a alimentação (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003).

Em estudos de Asojo et al. (2005), com a proteína Na-ASP-2 (pertencente à família CRISP-1, presente no parasita nematóide *Necator americanus*, verificou-se uma elevada similaridade na sequência primária e estrutura tridimensional dessa proteína com o antígeno-5 do veneno de vespas. Além disso, demonstrou-se o uso em potencial dessas proteínas no desenvolvimento de vacinas, as quais induziriam anticorpos ao bloquear ou interferir na interação receptor-ligante/vítima-animal, interrompendo a habilidade do sistema imune da vítima no desencadeamento de respostas de ativação celular.

Mediante os resultados do presente estudo, o antígeno-5 vem demonstrar uma de suas prováveis atividades biológicas ao desencadear respostas imunológicas e inflamatórias via ativação celular de mastócitos. Essa ativação é um dos eventos celulares que ocorrem quando determinadas moléculas se associam aos receptores de proteínas G e, essa ativação pode ocorrer por diferentes mecanismos: 1) pelo acoplamento do antígeno (ligação cruzada) aos receptores IgE da superfície de sua membrana celular, resultando em agregação dos receptores de alta afinidade FcεRI e a secreção de substâncias que podem ter ações efetoras, imunoreguladoras ou autócrinas. Como consequência desta ativação, temos três tipos de respostas biológicas: secreção de conteúdo pré-formado de seus grânulos por um processo regulado de exocitose, síntese e secreção de mediadores lipídicos, além de síntese e secreção de citocinas. Estas respostas resultam da ligação cruzada de FcεRI, que inicia uma cascata de sinalização nos mastócitos, envolvendo tirosinas quinases protéicas e levando a liberação de mediadores (KINET, 1999; NADLER et al., 2000; ABBAS et al.,

2008); 2) quando peptídeos policatiônicos se ligam aos receptores de proteínas G presentes nas membranas das células, onde suas subunidades $\beta\gamma$ estimulam a fosfolipase C, levando à liberação de mediadores (FERRY et al, 2001).

Os mastócitos são células especializadas na reação alérgica. Eles liberam seus grânulos quando apropriadamente estimulados durante uma resposta inflamatória ou alérgica, como quando um indivíduo é exposto a um antígeno para o qual ele foi sensibilizado. Os anticorpos produzidos contra o antígeno, as IgE, se ligam aos receptores Fc localizados na membrana plasmática dos mastócitos. Em uma segunda exposição ao mesmo antígeno, uma reação antígeno-anticorpo ocorre na superfície do mastócito, provocando alterações na membrana que promove a entrada de íons cálcio no citoplasma, os quais são responsáveis pela fusão dos grânulos e consequente extrusão por exocitose; com isso, o conteúdo dos grânulos é liberado para o meio extracelular (JUNQUEIRA, 2005; ROSS; PAWLINA, 2008).

Um estudo com abordagem proteômica do antígeno-5 na presença de células animais como mastócitos, células importantes do sistema imune responsáveis por processos de ativação celular, é uma estratégia promissora para a compreensão e desenvolvimento de novos fármacos ao elucidar a resposta de ativação celular de alérgenos de veneno de vespas e/ou parte deles como seus epítomos perante receptores acoplados as proteínas de membranas presentes nessas células de defesa.

6.2. Modelo tridimensional do antígeno-5

A antigenicidade do antígeno-5 pode ser determinada pela estrutura de seus epítomos, os quais dependem do arranjo espacial tridimensional dos aminoácidos do alérgeno para se ligar ao anticorpo. Sendo assim, a determinação da estrutura tridimensional do antígeno-5 é fundamental para o mapeamento dos epítomos e na caracterização do alérgeno em estudo.

Utilizando-se do alinhamento das sequências primárias dos antígenos-5 de vespas já descritos na literatura, foi possível escolher um molde para realizar a modelagem da estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa social

P. paulista. O molde escolhido foi o da vespa social *Vespula vulgaris* (PDB: 1QNX) resolvida por cristalografia de raio X a uma resolução de 1.9 Å (HENRIKSEN, et al., 2001). Esse molde apresenta uma identidade de 59% e uma similaridade de 73% com a sequência primária da proteína em estudo, isto indica que a estrutura tridimensional escolhida é um bom molde, pois a precisão na modelagem molecular por homologia de proteínas está relacionada à porcentagem de identidade na qual o modelo é baseado, estabelecendo uma correlação entre a similaridade estrutural e sequencial das duas proteínas (KOEHL, 1999; MARTIRENOM et al., 2000).

A imagem da estrutura tridimensional do modelo molecular do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista* foi gerada a partir do programa PyMOL (DELANO, 2002) e está ilustrada na figura 17.

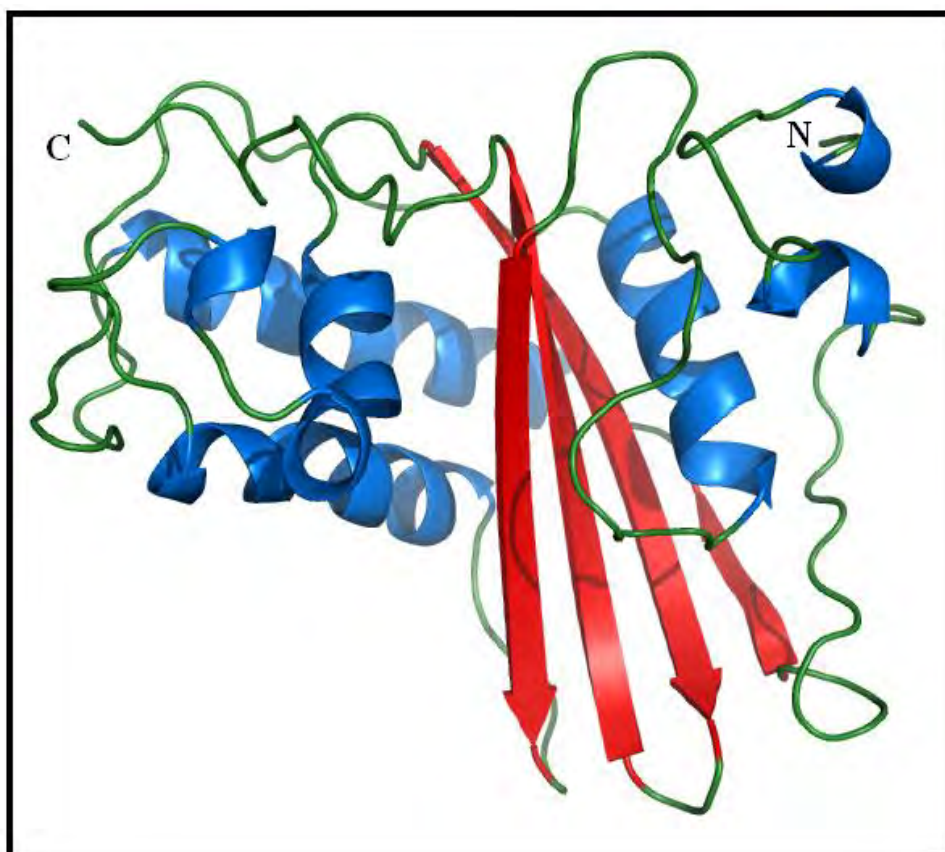


Figura 17: Modelo molecular da estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista*.

No modelo da estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, pode-se observar as seguintes estruturas secundárias: 4 hélices- α que cobrem cerca de 28% da sequência primária e 4 folhas- β que cobrem cerca de 17.9% da sequência primária; os outros 54.1% da sequência primária correspondem à voltas e estruturas aleatórias.

Em estudos de Pirpignani et al. (2002), o antígeno-5 da vespa *P. scutellaris rioplatensis* contém 22% de hélices- α , 22% de folhas- β e 56% da sequência primária correspondem à voltas e estruturas aleatórias, valores próximos àqueles obtidos no presente estudo, corroborando com a proximidade filogenética entre as duas espécies. Dados do estudo de cristalografia de raio X, correspondente ao antígeno-5 do veneno da vespa *V. vulgaris* mostram que a estrutura tridimensional do antígeno-5 da vespa *P. paulista* também se assemelha a estrutura do antígeno-5 dessa espécie, a qual apresenta 5 hélices- α e 4 folhas- β (HENRIKSEN et al., 2001).

Avaliar a qualidade do modelo é um quesito fundamental, pois ela será proporcional à qualidade da estrutura tridimensional utilizada como molde. Por isso, deve-se avaliar o modelo, como um todo, e, por região. Diversas metodologias existem para a avaliação da qualidade de uma estrutura, seja ela determinada experimentalmente ou por modelagem por homologia. Após a escolha do melhor modelo, análises mais criteriosas e detalhadas foram efetuadas com a utilização do Procheck (diagrama de Ramachandran e G-factor), Verify 3D e XPLOR (RMSD da geometria ideal), a fim de verificar a qualidade do modelo construído.

O programa Procheck foi utilizado para analisar a geometria global dos modelos através do diagrama de Ramachandran e o G-factor. Segundo Ramachandran, uma estrutura de boa qualidade deve ter 90% ou mais de seus resíduos nas regiões mais favoráveis. As áreas em branco correspondem a regiões onde existem os choques estereoquímicos na proteína. Estas regiões não permitidas estereoquimicamente valem para todos os aminoácidos exceto a glicina (Gly) que é a única que não tem cadeia lateral e pode adotar os ângulos de torção ϕ e ψ em todos os quadrantes do diagrama de Ramachandran. As áreas

vermelhas correspondem à conformação onde não há nenhum choque estereoquímico, ou seja, são as regiões permitidas e aonde se encontram as hélices- α e folhas- β . As áreas em amarelo escuro e claro mostram regiões limitantes, porém ainda ângulos permitidos ou generosamente permitidos, respectivamente.

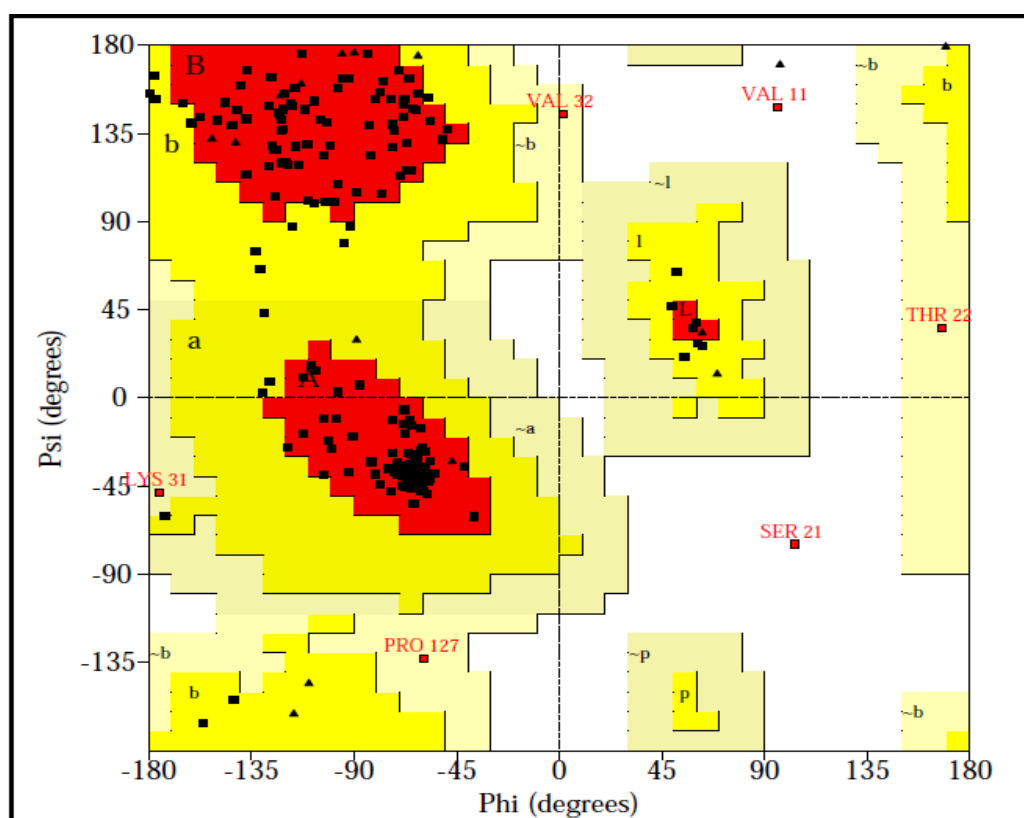


Figura 18: Avaliação da qualidade da estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista* através do diagrama de Ramachandran.

No presente estudo, o diagrama de Ramachandran do antígeno-5, ilustrado na figura 18, demonstra que 156 resíduos de aminoácidos do modelo estrutural estão localizados na região mais favorecida do gráfico (regiões em vermelho), 23 resíduos estão localizados na região adicionalmente favorecida (regiões em amarelo escuro), 3 resíduos estão localizados na região generosamente favorecida (regiões em amarelo claro) e 2 resíduos estão localizados na região não favorecida do gráfico (regiões em branco). Os resíduos que se encontram na

região não favorecida, não causam choques estereoquímicos, estão localizados nesta região por constituírem estruturas randômicas.

A partir da análise dos dados obtidos podemos concluir que o modelo gerado possui uma ótima qualidade estereoquímica, pois o mesmo apresenta mais que 90% de seus resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis do diagrama de Ramachandran. Dentre os 23 resíduos que faltam para totalizar os 207 resíduos de aminoácidos que constituem a sequência, 15 são resíduos de glicina que não são considerados por terem liberdade de se localizarem em qualquer região do diagrama de Ramachandran, 6 resíduos de prolina e 2 resíduos são os últimos da sequência os quais o Procheck não considera quando gera o diagrama de Ramachandran.

O G-factor médio dos ângulos de torção e geometria covalente representa uma medida do desvio de uma dada propriedade estereoquímica para cada resíduo de aminoácido da estrutura. O valor ideal deste fator deve ser acima de -0.5. Valores no intervalo de -0.5 a -1.0 significam que existem resíduos na proteína que devem ser investigados e, valores abaixo de -1.0, indicam que os modelos apresentam qualidade estereoquímica ruim e devem ser investigados. O G-factor global é a melhor medida da qualidade estereoquímica total de uma molécula, pois representa a média de todos os G-factor obtidos para cada aminoácido da estrutura. As análises utilizando o programa Procheck (diagrama de Ramachandran e G-factor), estão demonstradas na tabela 5.

Tabela 5: Análises para o modelo molecular utilizando o programa Procheck.

Regiões do diagrama de Ramachandran ϕ - ψ (%)				G-factor		
Mais Favorecida	Adicionalmente Favorecida	Generosamente Favorecida	Não Favorecida	Ângulos de torção	Geometria covalente	G-factor Global
84.8	12.5	1.6	1.1	-0.03	0.27	0.09

Para verificar a confiabilidade na compatibilidade entre a sequência primária e a estrutura tridimensional do modelo do antígeno-5 foi utilizado o programa Verify 3D. O valor obtido indica que a estrutura do modelo possui compatibilidade entre a sequência primária do modelo e a estrutura tridimensional obtida, pois o valor gerado para o modelo está acima do limite de 45%.

O valor do RMSD da geometria ideal para o comprimento e ângulo de ligação foi calculado através do programa XPLOR, que gera um arquivo com os valores do RMSD para as ligações e ângulos diedros e impróprios bem como contatos não ligados. Valores ideais para o comprimento e ângulo de ligação devem estar abaixo de 0.06 Å e 10.0°, respectivamente, para que a geometria da proteína como um todo esteja em equilíbrio. Os valores obtidos para o comprimento de ligação e ângulo de ligação, do modelo indicam que a geometria da estrutura tridimensional do antígeno-5 como um todo está em equilíbrio. As análises utilizando o programa Verify 3D e XPLOR (RMSD da geometria ideal) estão demonstradas na tabela 6.

Tabela 6: Análise para o modelo molecular utilizando o programa Verify 3D e XPLOR (RMSD da Geometria Ideal).

Verify 3D	RMSD	
Qualidade (%)	Comprimento de ligação (Å)	Ângulos de ligação (°)
94.7	0.023	1.8

Para medir a diferença estrutural entre as duas estruturas sobrepostas (o modelo proposto sobreposto no molde) foi calculado o RMSD da sobreposição. Efetuadas as sobreposições ótimas de todos os pares de átomos (C_{α} - C_{α}) entre as duas estruturas, obtivemos um valor do RMSD de sobreposição de 0.45Å, o que se manteve abaixo do limite (menor que 0.5Å). Através do valor obtido na sobreposição podemos dizer que não houve possíveis alterações de estrutura secundária ou alguma alteração na conformação da estrutura tridimensional do antígeno-5. A sobreposição foi realizada entre o modelo e o molde utilizando as coordenadas atômicas de cada um.

Através dos resultados de análise do modelo estrutural tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista*, podemos constatar que o modelo possui uma ótima qualidade estereoquímica e estrutural. Sendo que, com a determinação da estrutura tridimensional será possível identificar o mecanismo que desencadeia a reação alérgica provocada pela ferroada do inseto.

6.3. Mapeamento tridimensional dos epítomos lineares de células-B

Com a determinação da estrutura tridimensional foi possível realizar o mapeamento tridimensional dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*. As figuras 19 e 20 mostram a localização espacial tridimensional dos epítomos lineares imunoreativos a IgG humano e do epítomo linear imunoreativo a IgE humano, respectivamente.

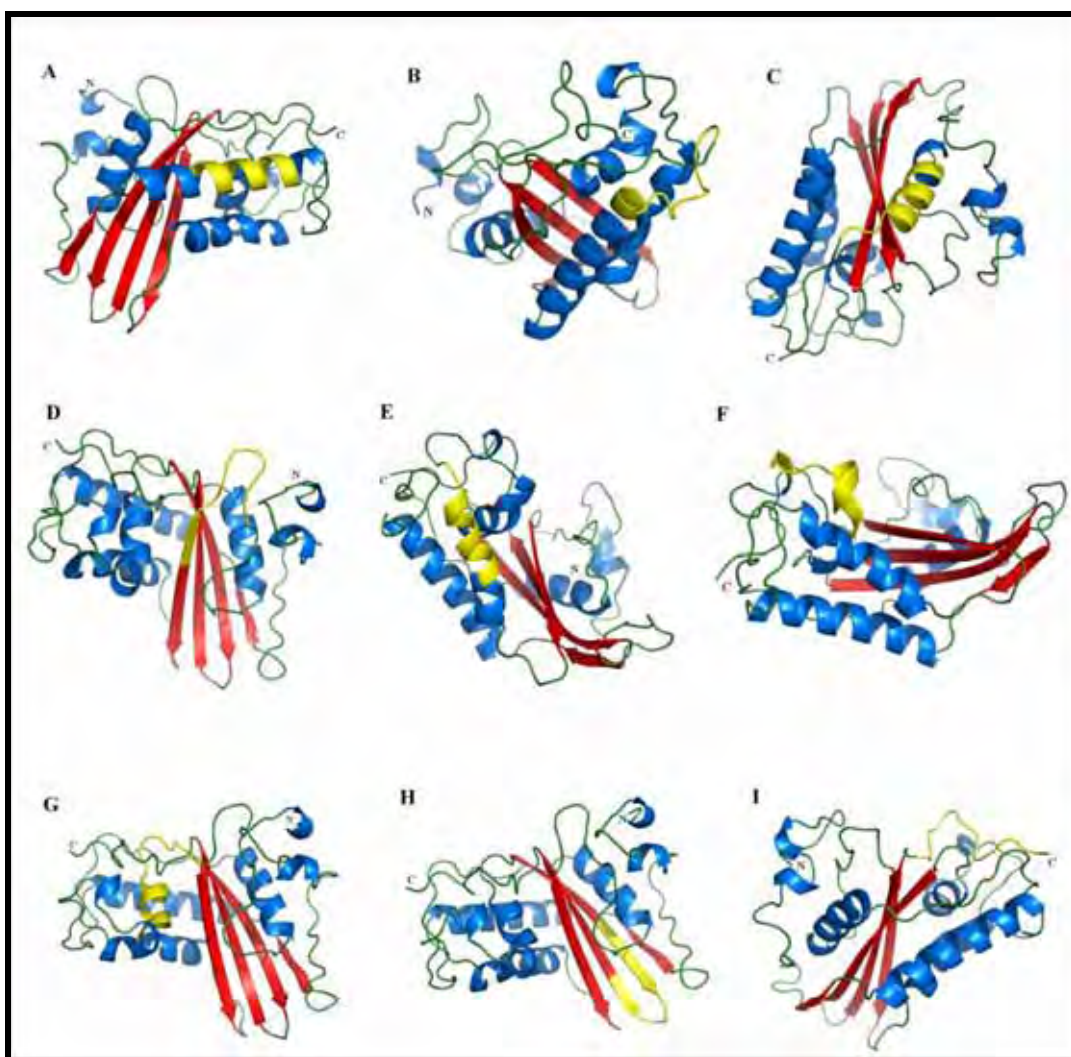


Figura 19: Mapeamento tridimensional dos epítomos lineares de células-B (assinalados em amarelo) do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativos a IgG humano. **A** – Epítomo 1; **B** – Epítomo 2; **C** – Epítomo 3; **D** – Epítomo 4; **E** – Epítomo 5; **F** – Epítomo 6; **G** – Epítomo 7; **H** – Epítomo 8; **I** – Epítomo 9.

Na proteína nativa, enovelada, os epítomos lineares são inacessíveis aos anticorpos e são expostos somente quando a proteína é denaturada. No entanto, se estiverem expostos na superfície ou em região de conformação estendida do alérgeno, esses epítomos podem ser acessíveis (ABBAS et al., 2008).

O mapeamento tridimensional dos epítomos lineares de células-B do antígeno-5, imunoreativos a IgG humano, demonstra que dos nove epítomos identificados, cinco (epítomos 2, 4, 6, 7 e 9) estão localizados em voltas e estruturas aleatórias, três (epítomos 1, 3 e 5) estão localizados em estruturas de hélice- α e um (epítomo 8) está localizado na lateral de uma folha- β , o que é incomum em se tratando de epítomos lineares, já que as folhas- β são estruturas rígidas que não favorecem a interação com anticorpos.

Considerando que os epítomos conformacionais são constituídos por dois ou mais diferentes trechos de epítomos, distantes uns dos outros e localizados em região de “loop” (voltas e estruturas aleatórias), e que o epítomo 8 identificado como linear está localizado em uma folha- β , podemos dizer que possivelmente esse epítomo seja parte de um epítomo conformacional, no qual a região central, formada por um “loop”, se mostrou acessível sendo reconhecida pela IgG.

Lembrando que esse epítomo foi detectado sendo constituído por 11 resíduos de aminoácidos, **SIKYIEKGMKS**, sendo que os resíduos pertencentes a região central desse epítomo, **IEKGM**, constitui a região do “loop”. Por outro lado, estudos futuros poderão ser realizados utilizando um outro algoritmo para a determinação da estrutura tridimensional do antígeno-5, o que tornará possível verificar a presença ou não das folhas- β na região em que está localizado o epítomo.



Figura 20: Mapeamento tridimensional do epítipo linear de células-B (assinalado em amarelo) do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativo a IgE humano.

No epítipo do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativo a IgE humano, podemos constatar que a menor sequência **WAKTKE** (Trp¹⁶⁵- Ala¹⁶⁶- Lys¹⁶⁷- Thr¹⁶⁸- Lys¹⁶⁹-Glu¹⁷⁰) que constitui esse epítipo apresenta um triptofano, resíduo aromático significativamente não-polar; uma alanina, resíduo não polar e hidrofóbico; duas lisinas, resíduos carregados positivamente e hidrofílicos; e um glutamato, resíduo carregado negativamente e hidrofílico. Esses resíduos estão expostos na superfície da molécula (Figura 21) sendo significativamente acessíveis e estão localizados em um “loop” (voltas e estruturas aleatórias) o que favorece a fácil interação com a IgE.

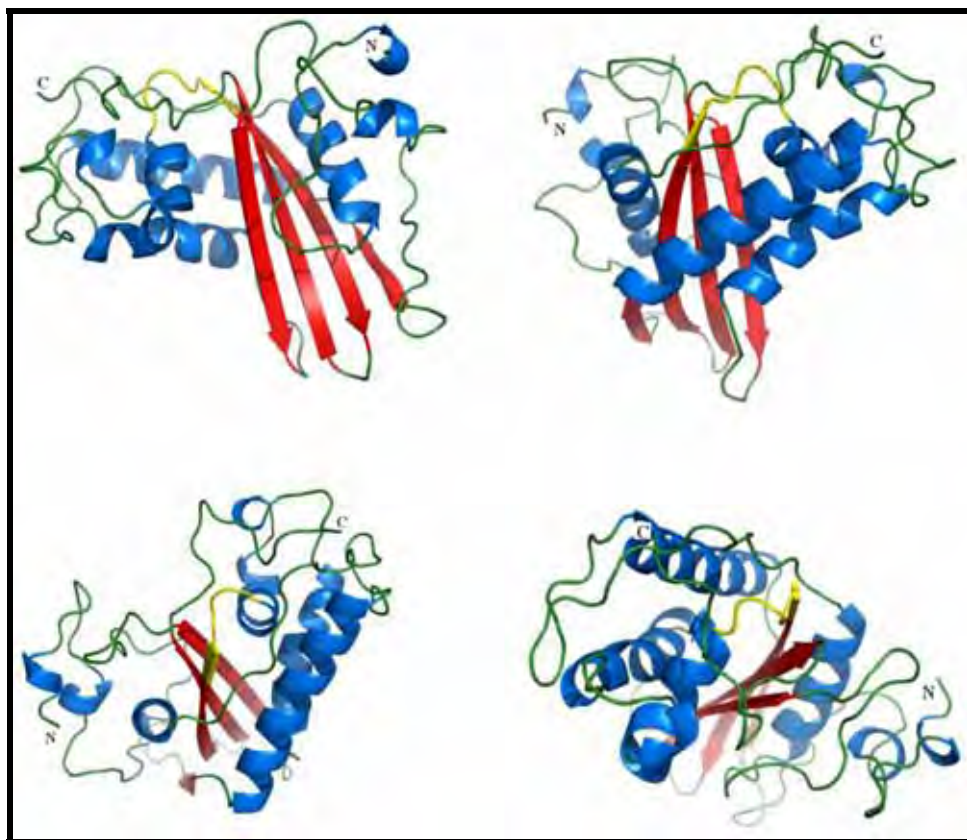


Figura 21: Mapeamento tridimensional do epítipo linear de células-B (assinalado em amarelo) do antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista*, imunoreativo a IgE humano. A imagem tridimensional em diferentes posições demonstra que o epítipo está exposto na superfície do alérgeno.

Qualquer parte acessível de uma molécula pode ser considerada potencialmente antigênica. Para a interação antígeno-anticorpo, o epítipo específico deve estar exposto na superfície da molécula. As características físico-químicas e estruturais seriam fatores que determinam um epítipo em comparação com o restante da superfície do antígeno?

O reconhecimento do antígeno pelo anticorpo envolve uma ligação não covalente reversível, sendo que vários tipos de interações não covalentes podem contribuir para a ligação do antígeno pelo anticorpo, incluindo forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (ABBAS et al., 2008). Esse reconhecimento e ligação pelo receptor de células-B é dependente das características químicas dos resíduos que constituem o epítipo. Alguns aminoácidos apresentam uma maior imunogenicidade que outros, sendo

frequentes na constituição dos epítomos como os resíduos de His, Lys, Ala, Leu, Asp e Arg (em ordem decrescente de imunogenicidade) (WESTWOOD, 2001).

Rubinstein et al. (2008) estudaram várias propriedades que podem caracterizar os epítomos de células-B. Nesse estudo, o tamanho de um epítomo foi definido como sendo o número de aminoácidos que o compõe. E foi demonstrado que esses epítomos são significativamente constituídos por tirosina, triptofano e resíduos de aminoácidos carregados e polares, devido a capacidade que possuem para formar uma multiplicidade de interações. Foi demonstrado também que esses epítomos são de superfície sendo significativamente mais acessíveis do que o restante da superfície do antígeno e constituídos por aminoácidos que possuem a cadeia lateral exposta, em comparação com o restante da superfície do antígeno. Isto sugere que os resíduos com cadeia lateral exposta desempenham um papel importante na formação do complexo antígeno-anticorpo favorecendo a interação. E ainda nesse estudo foi demonstrado que os epítomos de células-B estão localizados em “*loops*” (voltas e estruturas aleatórias) apresentando uma maior flexibilidade, o que facilita a interação com os anticorpos.

Os resultados desse estudo vêm corroborar os resultados obtidos com a caracterização do epítomo linear de células-B do antígeno-5, imunoreativo a IgE humano, do presente estudo. Sendo esse epítomo considerado imunodominante do antígeno-5 capaz de ativar o sistema imune.

Alérgenos de diferentes venenos podem apresentar semelhanças conformacionais de epítomos, tendo como consequência uma reatividade cruzada, o que impossibilita um diagnóstico preciso já que este é baseado na detecção da especificidade IgE-alérgeno. Portanto, o conhecimento das interações moleculares entre os alérgenos e os anticorpos IgE pode ser obtido a partir de estudos estruturais combinados com a caracterização bioquímica e imunológica conforme realizados nesse estudo. Dessa forma, essas informações poderão auxiliar o desenvolvimento de formas específicas de terapia contra um potencial alergênico tanto para processos de diagnósticos de alergia quanto para processos imunoterápicos na área de alergia e imunologia clínica atual.

A identificação da estrutura tridimensional de epítomos envolvidos em reações alérgicas possibilita não só uma melhor compreensão da resposta imune como também possibilita um estudo sobre os processos de reações cruzadas entre alérgenos homólogos (POMÉS, 2010). Ou seja, a habilidade de um antígeno ligar-se a um determinado anticorpo produzido primariamente contra outro antígeno.

O antígeno pode expressar um ou mais epítomos, denominando-se uni ou multivalente, respectivamente. Sendo assim, um anticorpo pode reconhecer epítomos idênticos ou similares. No primeiro caso, os anticorpos se ligam com a mesma afinidade, e, no segundo, ligam-se com menor afinidade (CASTRO et al., 2009). Estudos com a utilização de testes cutâneos, juntamente com novos métodos laboratoriais, têm demonstrado reatividade cruzada variável entre os insetos da ordem Hymenoptera. Evidentemente, insetos da mesma família apresentam maior reatividade cruzada que de famílias diferentes.

Na figura 22, mostramos a região do epítoto linear **VGHYTQVWAKTKE** (assinalada com asteriscos e delimitada por um área vermelha) do antígeno-5 do veneno da vespa *P. Paulista*, imunoreativo a IgE humano, alinhado com as sequências primárias do antígeno-5 de outras espécies de vespas já descritas na literatura

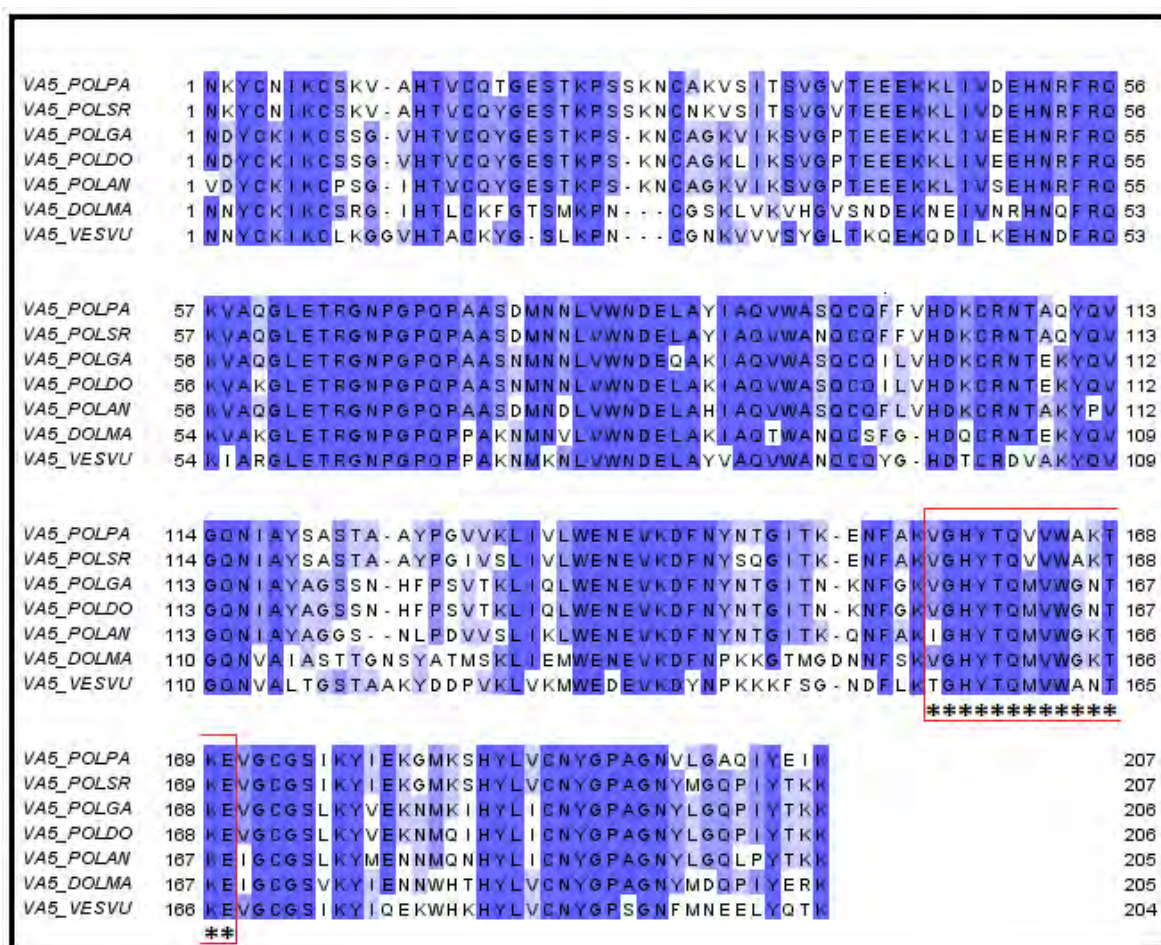


Figura 22: Alinhamento múltiplo entre a sequência primária do antígeno-5 da vespa social *Polybia paulista* (VA5_POLPA) com as sequências primárias do antígeno-5 das vespas *Polybia scutellaris rioplatensis* (VA5_POLSCR), *Polistes gallicus* (VA5_POLGA), *Polistes annularis* (VA5_POLAN), *Polistes dominula* (VA5_POLDO), *Dolichovespula maculata* (VA5_DOLMA) e *Vespula vulgaris* (VA5_VESVU). As regiões de identidade mais importantes estão assinaladas em azul escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados nesse tipo de alinhamento. A região do epítipo linear, imunoreativo a IgE humano, do antígeno-5 do veneno da vespa *P. Paulista* está assinalada com asteriscos e delimitada pela área vermelha.

A elevada identidade entre as sequências primárias dos antígenos-5 de várias espécies de vespas sociais promove uma ampla reatividade cruzada entre as diferentes espécies. O alinhamento entre as sequências primárias dos antígenos-5, demonstra que os resíduos de aminoácidos pertencentes ao epítipo linear do antígeno-5 do veneno da vespa *P. Paulista*, imunoreativo a IgE humano, apresentam-se conservados quase que na sua totalidade entres as sequências de antígenos-5 alinhadas. O modelo de reatividade cruzada entre diferentes

alérgenos está relacionado principalmente à similaridade entre suas sequências primárias, uma vez que os anticorpos são produzidos contra regiões altamente conservadas.

Nos estudos de Santos (2006), o antígeno-5 do veneno da vespa *P. paulista* demonstrou reatividade cruzada com os venenos da vespa *Agelaia pallipes pallipes* e da abelha *Apis mellifera* sendo imunoreativo em todos os experimentos realizados. Em outros estudos têm sido observada a reatividade cruzada entre antígenos-5 de vespas com proteínas da família CAP de outros animais e plantas (KING et al., 1996; HOFFMAN, 2006).

A reatividade cruzada é um fenômeno frequente em pacientes com alergia. A sensibilização contra alguns alérgenos podem causar reações em relação a outros alérgenos aparentemente não relacionados. Atualmente essas reações estão sendo investigadas com base em cada caso, analisando os níveis de IgE específica presente no soro e as características clínicas dos pacientes que sofrem de reações cruzadas (PFIFFNER et al., 2010). Sendo assim, é inquestionável a importância da reatividade cruzada entre os venenos de Hymenoptera sociais na prática clínica do alergologista, pois estas interações possuem impacto direto sobre o diagnóstico e melhor conduta terapêutica mediante os casos de reações alérgicas.

6.4. Ensaios de atividade biológica

Para o uso potencial dos epítopos identificados em futuras aplicações de diagnóstico e imunoterapia de hipersensibilidade a venenos de vespas, há a necessidade de segurança biológica sobre as atividades farmacológicas desses epítopos na forma isolada, i.e, como peptídeos livres. Sendo assim, todos os epítopos identificados foram sintetizados como peptídeos lineares (na forma ácida) e submetidos a ensaios de atividades hemolítica, desgranuladora de mastócitos, citolítica e quimiotática contra as células de mamíferos.

O primeiro ensaio realizado foi o de atividade hemolítica. A hemólise é definida como a degradação química das hemácias, porém, alguns processos como a interação antígeno-anticorpo, toxinas e venenos podem causar uma

degradação química prematura. Sendo assim, a quantidade de hemácias disponíveis para o transporte de oxigênio fica abaixo do normal.

Os resultados dos ensaios de hemólise estão demonstrados na figura 23 e foram expressos em porcentagem, valores obtidos através da comparação com o controle 100% realizado pela incubação dos eritrócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v).

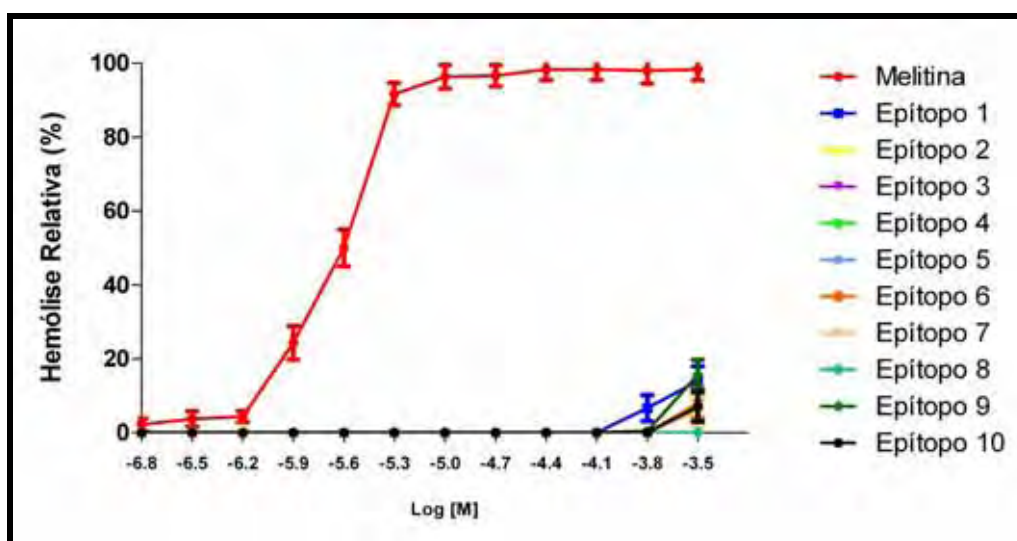


Figura 23: Atividade hemolítica dos peptídeos correspondentes aos epítopos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista* e do padrão melitina, em função da concentração variando de 1.5×10^{-7} a 3.1×10^{-4} M.

Sabe-se que a atividade hemolítica é dependente de perturbações na membrana dos eritrócitos causada pelos peptídeos. Porém, neste caso, os resultados demonstram que estas perturbações não ocorrem em presença dos peptídeos correspondentes aos epítopos lineares de células-B do antígeno-5. Podemos constatar que a melitina, um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana, utilizado como padrão, apresentou 100% de atividade hemolítica na concentração de 1.9×10^{-5} M, enquanto que todos os peptídeos testados não apresentaram nenhuma atividade hemolítica significativa.

O ensaio de desgranulação de mastócitos foi realizado utilizando-se a suspensão de mastócitos coletados da cavidade peritoneal de ratos *Wistar*. Os mastócitos são células encontradas em todos os tecidos de sustentação,

prevalecendo principalmente no revestimento gastrointestinal, no revestimento seroso da cavidade peritoneal e em torno dos vasos sanguíneos (YOUNG; HEATH, 2000).

Os resultados dos ensaios de desgranulação de mastócitos estão demonstrados na figura 24 e foram expressos em porcentagem, valores obtidos através da comparação com o controle 100% realizado pela incubação dos mastócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v). O peptídeo melitina também foi utilizado como padrão neste ensaio.

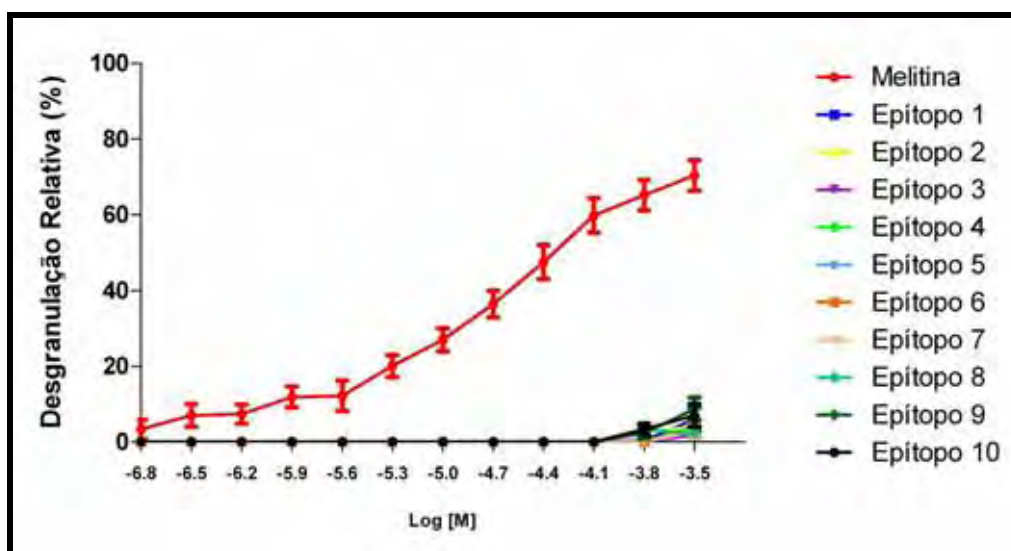


Figura 24: Atividade desgranuladora de mastócitos dos peptídeos correspondentes aos epítopos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista* e do padrão melitina, em função da concentração variando de 1.5×10^{-7} a 3.1×10^{-4} M.

Os mastócitos são células preenchidas com vários grânulos que contêm histamina e outros potentes agentes biologicamente ativos. Quando expostos a substâncias estranhas, liberam os grânulos citoplasmáticos ocasionando a desgranulação (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005). Os resultados demonstram que em presença dos peptídeos correspondente aos epítopos do antígeno-5, não ocorre a desgranulação dos mastócitos. Já na presença do peptídeo padrão, melitina, podemos constatar a ocorrência de 50% de desgranulação na concentração de 3.9×10^{-5} M, enquanto que todos os peptídeos testados não apresentaram nenhuma atividade desgranuladora significativa.

A atividade de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos coletada da cavidade peritoneal de ratos *Wistar*, assim como descrito para os ensaios de desgranulação. Os resultados de LDH estão demonstrados na figura 25 e foram expressos em porcentagem, valores obtidos através da comparação com o controle 100% realizado pela incubação dos mastócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v). O peptídeo melitina também foi utilizado como padrão neste ensaio.

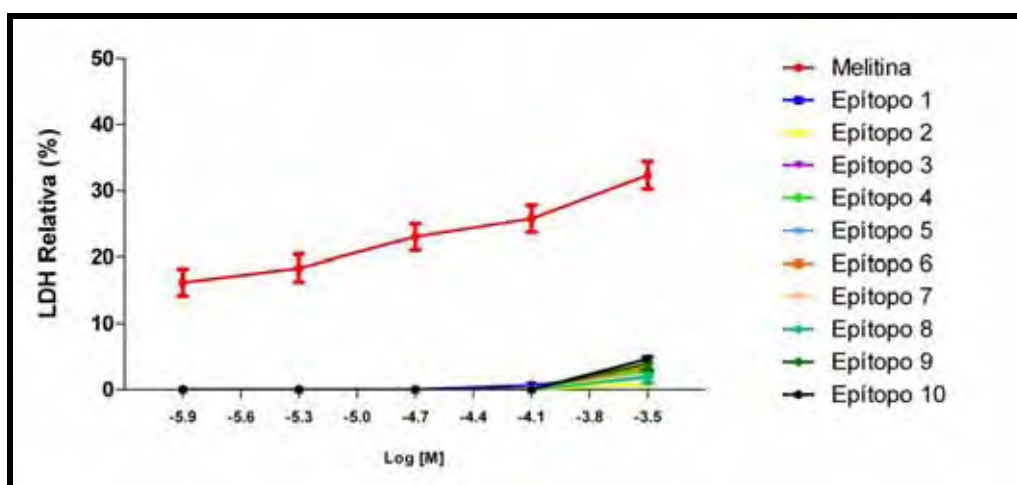


Figura 25: Atividade da medida da enzima lactato desidrogenase – LDH dos peptídeos correspondentes aos epítopos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista* e do padrão melitina, em função da concentração variando de 1.2×10^{-6} a 3.1×10^{-4} M.

A atividade da medida da enzima lactato desidrogenase mede a liberação da lactato desidrogenase do citoplasma dos mastócitos, para o meio extracelular, como indicador de lise dos mastócitos pelo peptídeo. Os resultados demonstram que em presença dos peptídeos correspondentes aos epítopos lineares de células-B do antígeno-5, não ocorre essa liberação da lactato desidrogenase do citoplasma dos mastócitos. Na presença do peptídeo padrão, melitina, podemos constatar a ocorrência de 32% de LDH na concentração de 3.1×10^{-4} M, enquanto que todos os peptídeos testados não apresentaram nenhuma atividade de LDH significativa.

O ensaio de quimiotaxia foi realizado utilizando-se a suspensão de leucócitos coletados a partir da indução de uma inflamação subcutânea em ratos *Wistar*. A quimiotaxia é um mecanismo de locomoção de células orientada ao

longo de um gradiente químico que ocorre através da ligação do estímulo quimiotático a receptores específicos transmembranares dos leucócitos.

Os resultados dos ensaios de quimiotaxia estão demonstrados na figura 26 e foram expressos na forma do número de células que migraram para a parte inferior de cada um dos orifícios da câmara, em função da concentração molar de cada peptídeo. A protonectina 1-6, peptídeo potencialmente quimiotático presente no veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* foi utilizado como padrão.

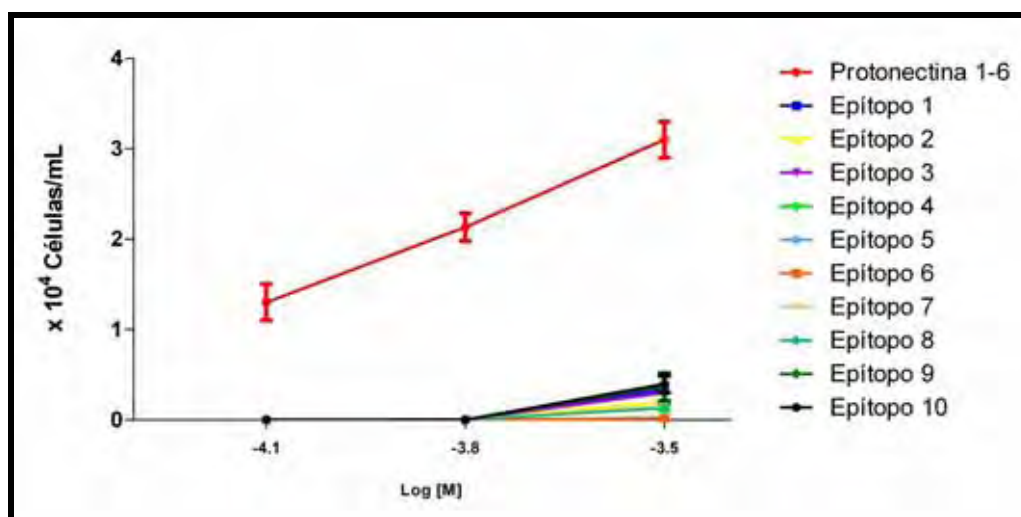


Figura 26: Atividade quimiotática dos peptídeos correspondente aos epítopos lineares de células-B do antígeno-5 do veneno da vespa social *P. paulista* e do padrão protonectina 1-6, em função da concentração variando de $3,9 \times 10^{-5}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.

Na quimiotaxia, leucócitos, neutrófilos e macrófagos migram para o local de inflamação ou infecção no organismo. Estas células, por sua vez, realizam a fagocitose dos elementos que estão na origem da inflamação e produzem mais mediadores químicos, dentre os quais estão as citocinas (como, por exemplo, o fator de necrose tumoral e as interleucinas), quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. Podemos constatar que, na presença dos peptídeos correspondente aos epítopos do antígeno-5, essa migração não ocorre pois não há um aumento de gradiente químico. O peptídeo padrão, protonectina 1-6, apresentou um valor de $3,2 \times 10^4$ células/mL que migraram em direção a um

gradiente químico na concentração de 3.1×10^{-4} M , enquanto que todos os peptídeos testados não apresentaram nenhuma atividade quimiotática.

Mediante os resultados dos ensaios de atividade biológica realizados, podemos constatar que os peptídeos correspondentes aos epítomos lineares de células-B do antígeno-5, quando isolados da estrutura tridimensional, ou seja, na forma de peptídeos livres, não apresentaram nenhuma atividade biológica significativa contra as células de mamíferos. Sendo assim, esses epítomos tornam-se candidatos em potencial para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapia específica contra o veneno da vespa *P. paulista*. Uma vez que, a não apresentação de atividade biológica resulta em diminuição de efeitos colaterais indesejados que são comumente relatados em casos de imunoterapia.

7. CONCLUSÃO

- A sequência primária do antígeno-5 do veneno da vespa social *Polybia paulista*, apresentou-se muito conservada em relação aos antígenos-5 de outras espécies de vespas sociais comparadas nesse estudo;
- Relatamos, pela primeira vez em toxinas de venenos de Hymenoptera sociais, a caracterização de um epítopo linear de células-B imunoreativo a IgE humano; além da identificação de outros nove epítopos imunoreativos a IgG humano;
- Com a determinação da estrutura tridimensional do antígeno-5 foi possível mapear tridimensionalmente os epítopos lineares de células-B identificados;
- O mapeamento tridimensional do epítopo linear imunoreativo a IgE humano demonstrou que esse epítopo está exposto na superfície da molécula sendo significativamente acessível, e está localizado em um “loop” (voltas e estruturas aleatórias) o que favorece a interação com a IgE;
- Os peptídeos correspondentes aos epítopos lineares de células-B do antígeno-5, quando isolados da estrutura tridimensional, não apresentaram nenhuma atividade biológica significativa contra as células de mamíferos mediante os ensaios realizados;
- Os epítopos identificados tornam-se candidatos em potencial para o desenvolvimento de vacinas, testes de diagnósticos e imunoterapia específica contra o veneno de vespas;

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, podemos constatar a eficiência da combinação da abordagem análise proteômica com o entendimento estrutural e funcional de proteínas, culminando com a identificação e mapeamento de epítomos. Dessa maneira, as informações geradas nesse estudo poderão auxiliar o desenvolvimento de formas específicas de terapia contra um potencial alergênico, tanto para processos de diagnósticos de alergia, quanto para processos imunoterápicos na área de alergia e imunologia clínica atual.

9. Referências Bibliográficas

AALBERSE, R.C. Structural Biology of Allergens. **J. Allergy Clin Immunol**, Saint Louis, v.106, n.2, p.228-238, 2000.

ABBAS, K. A., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunologia celular e Molecular**. 6^a ed. Saunders, Rio de Janeiro, 215-242; 441-462, 2008.

ALLES, I. M. **Síntese em fase sólida, caracterização e estudo conformacional da δ - melanotropina e da δ -melanotropina oxidada**. Dissertação (Mestrado em Química, área de Química orgânica), Universidade Federal de Santa Maria, RS, p. 98, 2005.

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

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

ASOJO, O. A.; GOUD, G.; DHAR, K.; LOUKAS, A.; ZHAN, B.; DEUMIC, V.; LIU, S.; BORGSTHAL, G. E. O.; HOTEZ, P. X-ray structure of Na-ASP-2, a Pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. **J. Mol. Biol.**, 346, 801-814, 2005.

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

BAYAT, A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. **BMJ**, v. 324, p. 1018-1022, 2002.

BECKER, W. M; REESE, G. Immunological identification and characterization of individual food allergens. **Journal of Chromatography B**, 756, 131-140, 2001.

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

BOHLE, B.; ZWÖLFER, B.; FISCHER, G.F.; SEPPÄLÄ, U.; EBNER, C. Characterization of the human T cell response to antigen-5 from *Vespa vulgaris* (Ves v 5). **Clin. Exp Allergy**, 35, p. 367-373, 2005.

BROTHERS, D. J.; CARPENTER, J. M. Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea (Hymenoptera). **Journal of Hymenoptera Research**, 2, 227-304, 1993.

BURLEY, S.K.; ALMO, S.C.; BONANNO, J.B.; CARPEL, M.; CHANCE, M.R.L.; GAASTERLAND, T.; LIN, D.; SALI, A.; STUDIER, F.W. & SWAMINATHAN, S. Structural genomics: beyond the human genome project. **Nat. Genet.** 23:151-157, 1999.

CALVO, E.; DAO, A.; PHAM, V. M.; RIBEIRO, J. M. Na insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals na emerging pattern in anopheline salivary protein families. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 37, 164-175. 2007.

CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C. **Células: uma análise multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Manole. 2005.

CASCONE, O.; AMARAL, V.; FERRARA, P.; VITA, N.; GUILLEMOT, J. C.; DÍAZ, L.E. Purification and characterization of two forms of antigen-5 from the *Polybia scutellaris* venom. **Toxicon**, Elmsford, v.38, p. 1367-1379, 1995.

CASTRO, F.F.M.; PALMA, M.S.; BROCHETTO-BRAGA, M.R.; MALASPINA, O.; LAZARETI, J.; BALDO, M.A.B.; ANTILA, M.A.; ZUPI, L.; CONSERMELLI, W. Biochemical properties and study of cross-antigenicity between Africanized honey bee and wasp venom. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, New York, v.4, p.37-41, 1994.

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, p.132, 2001.

CASTRO, F. F. M.; PALMA, M. S. **Alergia a venenos de insetos**. Ed. Manole, Barueri-SP, 230p., 2009.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J.M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc Natl Acad Sci.**, USA, 96, p. 15155-15160, 1999.

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

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

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

CUFF, J. A.; BARTON, G.J. Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. **Proteins** 40:502-511, 2000.

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

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

DE SILVA, W. D.; MOTA, I. **Imunologia Básica e Aplicada**. Ed. Guanabara Koogan, 2003.

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

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

ESHER, S.H.G.; CASTRO, A.P.B.M.; CROCE, J.; PALMA, M.S.; MALASPINA, O.; PALMA, M.F.M.; KALLI, J.E.; CASTRO, F.F.M. Study of laboratorial methods for Hymenoptera allergy diagnosis: A critical analysis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.107, n.2, p.375, 2001.

FERNANDEZ, J.; RODES, F.; MARTI, J.; BLANCA, M. Wasp sting anaphylaxis as a cause of death: a case report. **Allergol. Immunopathol.**, Madri, v.20, p.40-41, 1992.

FALK, W.; LEONARD, E. J. Human monocyte chemotaxis: migrating cells are a subpopulation with multiple chemotaxin specificities on each cell. **Infect Immun.**, 29, p.953-959, 1980.

FERRY, X.; EICHWALD, V.; DAEFFLER, L.; LANDRY, Y. Activation of $\beta\gamma$ subunits og Gi2 and Gi3 proteins by basic secretagogues induces exocytosis through phospholipases C β and arachidonate release through phospholipases Cy in mast cells. **J. Immunol.**, v.167, p.4805-4813, 2001.

FRANK, R. SPOT-Synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane supports. **Tetrahedron**, 48, p.9217-9232, 1992..

FRANK, R. The SPOT-Synthesis technique synthetic peptide arrays on membrane supports – principles and applications. **J. Immunol Methods**. 267, p.13-26, 2002.

FREEMAN, T.M. Hypersensitivity to Hymenoptera Stings. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.351, p.1978-1984, 2004.

FRIEDER, M.; LEWINSOHN, D. M. T-cell epitope mapping in *Mycobacterium tuberculosis* using pepmixes created by micro-scale SPOT- synthesis. **Methods Mol Biol.**, 524, p.369-382, 2009.

GARCIA-GARCIA, J. C.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; HALBUR, T.; ONET, V.; SALIKI, J. T. Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 98, p.137–151, 2004.

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

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**, 29(7), p. 865-897, 2008.

GOLDSBY, R.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A.; KUBY, J. **Immunology - Antigens**. New York, 5^a ed. W. H. Freeman and Company, p.57-75, 2003.

GRUNWALD, T.; BOCKISCH, B.; SPILLNER, E.; RING, J.; BREDEHORST, R.; OLLERT, M.W. Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). **J. Allergy Clin. Immunol.**, 117, p. 848-854, 2006.

GUEx, N; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v.18, p. 2714-2723, 1997.

GUTTE, B. **Peptides: Synthesis, structure and applications**. Academic Press: New York, 1995.

HABERMANN, E.; NEUMAN, W.P. Reinigung der phospholipase A des bienengftes. **Biochem.**, Moscow, v.28, p.465-473, 1957.

HAMILTON, R.G. Diagnostic methods for insect sting allergy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, London, v.4, n.4, p.297-306, 2004.

HENRIKSEN, A.; KING, T. P.; MIRZA, O. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: Structural characterization of a Pathogenesis-related protein superfamily. **Proteins: Structure and Genetics**, 45, 438-448, 2001.

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

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

HOFFMAN, D.R.; EL-CHOUFANI, S.E.; SMITH, M.M; de GROOT, H. Occupational allergy to bumblebees: allergens of *Bombus terrestris*. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.108, n.5, p.855-860, 2001.

HOFFMAN, D.R.; WEIMER, E.T.; SAKELL, R.H.; SCHMIDT, M. Sequence and characterization of honeybee venom acid phosphatase. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 115, S107-S107, 2005.

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

HOLOWKA, D.; BAIRD, B. Antigen-mediated IgE receptor aggregation and signaling: A window on cell surface structure and dynamics. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25, p. 79-112, 1996.

HUJER, A. M. Bethel CR and Bonomo RA. Antibody mapping of linear epitopes of CMY-2 and SHV-1 beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48: 3980-3988, 2004.

IRVING, M. B.; PAN, O.; SCOTT, J. K. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitopes mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, p.314-324, 2001.

JARVINEN, K. M.; BEYER, K.; VILA, L.; BARDINA, L.; MISHOE, M.; SAMPSON, H. A. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. **Allergy**, 62: 758–765, 2007.

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

JUNQUEIRA, L.C.U. **Biologia estrutural dos tecidos: histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen specific immunotherapy T-cell tolerance and more. **Allergy**, 61, p. 796-807, 2006.

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

KINET, J.P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. **Annu. Rev. Immunol.**, v.17, p.931-972, 1999.

KING, T. P. **Cloning and sequencing vespid venom allergens: Sequence similarity and antigenic cross reactivity of hornet antigen 5 and tobacco leaf protein.** In *Allergy and Molecular Biology*. Ed. Pergamom Press, New York, v.74, p.129-136, 1989.

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

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

KO, L.; MAITLAND, A.; FEDAK, P.W.M.; DUMONT, A. S. Endothelin blockade potentiates endothelial protective effects of ace inhibitors in saphenous veins. **Ann. Thorac. Surg.**, 73, 1185-1188, 2002.

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

KOLARICH, D.; LÉONARD, R.; HERMMER, W.; ALTMANN, F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. **The FEBS Journal**, Amsterdam, v.272, p.5182-5190, 2005.

KOVALICK, G. E.; SCHREIBER, M. C.; DICKASON, A. K.; CUNNINGHAM, R. A. Structure and expression of the antigen-5 related gene of *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 28, p. 491-500, 1998.

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

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

LI, M.; GUSTCHINA, A.; ALEXANDRATOS, J.; WUNSCHMANN, S.; KEPLEY, C.L.; CHAPMAN, M.D.; POMÉS, A. Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. **J. Biol. Chem.**, 283, p. 22806-22814, 2008.

LINHART, B.; VALENTA, R. Molecular design of allergy vaccines. **Curr. Opin. Immunol.** 17, p. 646-655, 2005.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICO, F.; GIRAL, E. **Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins**. Barcelona, Spin, 1997.

LOTTERSBERGER, J.; GUERRERO, S. A.; TONARELLI, G. G.; FRANK, R.; TARABLA, H.; VANASCO, N. B. Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. **Lett Appl Microbiol**, 49, p.641-645, 2009.

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

LUU, T.; PHAM, S.; DESHPANDE, S. **Int. J. Pept. Protein Res.**, 91, 47,1996.

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

MARKOVIC-HOUSLEY, Z.; PADAVATTAN, S.; SCHIRMER, T.; SCHMIDT, M.; AKDIS, C.; VALENTA, R.; MITTERMANN, I.; SOLDATOVA, L.; SLATER, J.; MULLER, U. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. **J. Mol. Biol.** 368, p. 742-752, 2007.

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

MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G.; SCHWAN, T. G.; RIBEIRO, J. M. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 38, p. 42-58, 2008.

MENDES, M.A.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S. Structure and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, v.45, p.101-106, 2005.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v.85, p.2149-2154, 1963.

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

MIN, D. -H.; SU, J.; MRKSICH, M. Profiling kinase activities by using a peptide chip and mass spectrometry. **Angew. Chem. Int. Ed.** 43, p. 5973-5977, 2004.

MIRZA, O.; HENRIKSEN, A.; IPSEN, H.; LARSEN, J.N.; WISSENBACH, M.; SPANGFORT, M.D.; GAJHEDE, M. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. **J. Immunol.**, 165, p. 331-338, 2000.

MOKFIENSKI, J. J. **Mapeamento imunológico de epítomos lineares de células-B do vírus vaccínia, homólogos ao vírus varíola.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Biologia Celular e Molecular – Instituto Oswaldo Cruz), Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p.72, 2007.

MOLINA, F.; LAUNE, D.; GOLGAT, C.; PAU, B.; GARNIER, C. Improved performances of Spot multiple peptide synthesis. **Peptide Res** 9: 151-155, 1996.

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

NADLER, M.J.; MATTHEWS S.A.; TURNER, H.; KINET, J.P. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor FcεRI: coupling form to function. **Adv. Immunol.**, v.76, p.325-355, 2000.

NIEDERBERGER, V.; VALENTA, R. Recombinant Allergens for Immunotherapy. Where do we stand? **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, London, v.4, p.549-554, 2004.

NIEMI, M.; JYLHA, S.; LAUKKANEN, M.L.; SODERLUND, H.; KALLIO, J.M.; HAKULINEN, N.; HAAHTELA, T.; TAKKINEN, K.; ROUVINEN, J. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the beta-lactoglobulin allergen. **Structure**, 15, p. 1413-1421, 2007.

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

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

OLIVEIRA, M.R.P. **Efeitos do veneno bruto de *Polybia paulista* (lehring, 1896) em camundongos:** Estudos bioquímicos, farmacológicos e morfológicos. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.135, 2000.

PADAVATTAN, S.; SCHIRMER, T.; SCHMIDT, M.; AKDIS, C.; VALENTA, R.; MITTERMANN, I.; SOLDATOVA, L.; SLATER, J.; MUELLER, U.; MARKOVIC-HOUSLEY, Z. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee

venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. **J. Mol Biol.**, 368, p. 742-752, 2007.

PADAVATTAN, S.; FLICKER, S.; SCHIRMER, T.; MADRITSCH, C.; RANDOW, S.; REESE, G.; VIETHS, S.; LUPINEK, C.; VALENTA, R.; MARKOVIC- HOUSLEY, Z. High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography. **J. Immunol.**, 182, p. 2141-2151, 2009.

PALMA, M. F. M.; PALMA, M. Aspectos entomológicos das alergias provocadas por ferroadas de Hymenoptera sociais. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, São Paulo, v.15, p. 123-125, 1992.

PALMA, M. S.; BRAGA, M. R. B. **Venenos de Hymenoptera Sociais**: Coleta, Composição, Bioquímica e Mecanismos de Ação. **Venenos Animais: uma Visão Integrada**. Editora de Publicações Científicas Ltda, Rio de Janeiro, p.251-258, 1994.

PALMA, M. S. **Insect Venom Peptides**. In: Abba Kastin (Texas University). (Org.). **Handbook of Biologically Active Peptides**. 1^a ed. San Diego, CA, USA: Elsevier/Academic Press, v. 1, p.409-417, 2006.

PANTERA, B.; HOFFMAN, D.R.; CARESI, L.; CAPPUGI, G.; TURILLAZZI, S.; MANAO, G.; SEVERINO, M.; SPADOLINI, I.; ORSOMANDO, G.; MONETI, G.; PAZZAGLI, L. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1623, p.72-81, 2003.

PIFFNER, P.; TRUFFER, R.; MATSSON, P.; RASI, C.; MARI, A.; STADLER, B. M. Allergen cross reactions: a problem greater than ever thought? **Allergy**, 65: 1536–1544, 2010.

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

POMÉS, A. Relevant B Cell Epitopes in Allergic Disease. **Int Arch Allergy Immunol**, 152:1–11, 2010.

REISMAN, R.E.; MUELLER, V.; WYPYCH, J. Comparison of the Allergenicity of Yellow Jacket and Hornet Venoms. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 69: p.268-274, 1984.

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

REINEKE, U.; KRAMER, A.; SCHNEIDER-MERGENER, J. Antigen sequence and library based mapping of linear and discontinuous protein-protein-interaction sites by spot synthesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, 243, p. 23-36, 1999.

REINEKE, U.; VOLKMER-ENGERT, R.; SCHNEIDER-MERGENER, J. Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. **Curr Opinion in Biotechnology**, 12, p. 59-64, 2001.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol.**, 48, p. 73-88, 2003.

RICHARDS, O. W.; RICHARDS, M. J. Observations on the social wasps of South America (Hym., Vespidae). **Transactions Royal Entomological Society**, 102 (1): 1-170, 1951.

RICHARDS, O. W. **The Social Wasps of the Americas Excluding the Vespidae**. London, British Museum (Natural History). p.580, 1978.

RICHES, H. R. C. Hypersensitivity to bee venom. **Bee World**, Bucks, v.63, p.7-22, 1982.

RODDA, A. J.; GEYSEN, G.T. In: M. H. V. van Regenmortel (Ed.), **Structure of Antigens**, Vol. 3, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 37, 1993.

ROSS, R.N.; NELSON, H.S.; FINEGOLS, I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of Hymenoptera venom hypersensitivity: a meta-analysis. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v.22, p.351-358, 2000.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia – textos e atlas – em correlação com Biologia Celular e Molecular**. 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

RUBINSTEIN, N. D.; MAYROSE, I.; HALPERIN, D.; YEKUTIELI, D.; GERSHONI, J. M.; PUPKO, T. Computational characterization of B-cell epitopes. **Molecular Immunology**, 45, p. 3477-3489, 2008.

SAKAKIBARA, S. Synthesis of large peptides in solution. **Biopolymers**, 37, 17-28, 1995.

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

SANTOS, L. D. **Caracterização Molecular dos Antígenos Imunodominantes do Veneno da Vespa Social *Polybia paulista***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.181, 2006.

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

SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; PINTO, J. R. A. S.; DIAS, N. B.; SOUZA, B. M.; SANTOS, M. F.; PERALES, J.; DOMONT, G. B.; CASTRO, F. M.; KALIL, E. J.; PALMA, M. S. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: A clue to understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research**, 9, p.3867-3877, 2010.

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

SCHMIDT, M.; WINNINGHAM, K.M.; HOFFMAN, D.R. The bee venom protease allergen contains a CUB domain. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.109, p.79, 2002.

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

SKOV, L. K.; SEPLL, U.; COEN, J. J. F.; CRICKMORE, N.; KING, T. P.; MONSALVE, R. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Angstrom resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. **Acta Crystallogr., D. Biol. Crystallogr.** 62, p. 595-604, 2006.

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

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

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

TOZZI, C.; ANFOSSI, L.; GIRAUDI, G. Affinity chromatography techniques based on the immobilisation of peptides exhibiting specific binding activity. **Journal of Chromatography B**, v.797, p.289-304, 2003.

WANG, C. Y.; WALFIELD, A. M.; FANG, X.; HAMMERBERG, B.; YE, J.; LI, M. L.; SHEN, M.; ALEXANDER, V.; MACGLASHAN, D. W. Synthetic IgE peptide vaccine for immunotherapy of allergy. **Vaccine**, 21, 1580-1590, 2003.

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

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

YANG, Y. P.; LIU, C. B.; JIN, D. Y.; ZHAN, M. Y.; TANG, Q.; XIA, N. S.; CAO, J. Y.; LI, J. Y. cDNA cloning of c33-c antigen gene derived from NS3 region of Chinese HCV genome, expression in *Escherichia coli* and development of HCV EIA second-generation diagnostic kit. **Sci. China**, Ser. B, 37, 190-202, 1994.

YEE, C. J.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O.; CASTRO, F. M.; AZEVEDO-NETO, R. S.; MANSO, E. C.; CROCE, J. Acquired immunity to African honeybee (*Apis mellifera*) venom in Brazilian beekeepers. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Saint Louis, v.7, p.583-587, 1997.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. **Histologia Funcional - texto e atlas em cores**. 4^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee – www.allergen.org – acessado em 04/03/2011.

www.uniprot.org/uniprot - acessado em 04/03/2011.

Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) – www.immuneepitope.org – acessado em 04/03/2011.