
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ana Maria Caviquioli Garcia

Proteômica como estratégia para estudos dos mecanismos de ativação de mastócitos de ratos causados pelo peptídeo Protopolybia MP-III

A large, abstract geometric design in the bottom half of the page, consisting of various shades of blue and white triangles and polygons arranged in a complex, overlapping pattern.

Rio Claro

2015

Ana Maria Caviquioli Garcia

Proteômica como estratégia para estudos dos mecanismos de ativação de mastócitos de ratos causados pelo peptídeo Protopolybia MP-III

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Co-orientadora: Msc. Anally Ribeiro da Silva Menegasso

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

Rio Claro

2015

595.798 Garcia, Ana Maria Caviquioli
G216p Proteômica como estratégia para estudos dos mecanismos de ativação
de mastócitos de ratos causados pelo peptídeo Protopolybia MP-III / Ana
Maria Caviquioli Garcia. - Rio Claro, 2015
102 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Mario Sergio Palma
Coorientador: Anally Ribeiro da Silva Menegasso

1. Vespa. 2. Análise proteômica shotgun. 3. Mastoparano. I. Título.

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

Dedico este trabalho a todos os seres pequeninos,
tão cativantes, cuja vida este estudo dependeu.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos aqui presentes são apenas singelas gratulações a todos que contribuíram de modo incessante para a realização desta obra. De forma que as gratificações são para:

Minha família que me auxiliou com recursos incansáveis, sem mais delongas para aqueles que com muita honradez me fizeram parte integrante dessa grei.

O grupo de trabalho do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica pela experiência compartilhada e conhecimento adquirido. Foram vários os integrantes da equipe que conheci, portanto agradeço de maneira generalista a todos os que me ensinaram e pacientemente me ofereceram ajuda quando precisei. No entanto, um especial apreço aos amigos proteômicos, muito queridos, obrigada novamente.

O orientador Mario Sergio Palma que me ofertou uma vaga em seu laboratório, bem como me proporcionou o privilégio de estar ao lado de um distinto cientista, e que com muita sabedoria e integridade soube compor a minha formação superior.

Meus amigos que a gente vai levando de teimoso e de pirraça. A gente vai tomando que, também, sem a cachaça ninguém segura esse rojão. E ao Wilde a sorte de um amor tranquilo.

Às turmas de Ciências Biológicas Integral de 2010 e 2011 pelas amizades que me proporcionaram, assim como pelas desventuras de noites mal dormidas fazendo trabalhos em conjunto. Especial agradecimento à Veck que me ajudou no estudo de diversas disciplinas, muito obrigada.

À Instituição Unesp e ao Centro de Estudos de Insetos Sociais, bem como os respectivos funcionários e aos Órgãos de fomento: FAPESP, CNPq, CAPES e ao Instituto de Investigação em Imunologia.

Cuidado com seus pensamentos, pois eles se tornam palavras.

Cuidado com suas palavras, pois elas se tornam ações.

Cuidado com suas ações, pois elas se tornam em hábitos.

Cuidado com seus hábitos, pois eles moldam o seu caráter.

E cuidado com seu caráter, pois ele decidirá o seu destino.

(THE IRON lady, 2011)

RESUMO

No decorrer das últimas décadas, a Secretaria de Vigilância em Saúde relata o crescente número de acidentes ocasionados por abelhas e vespas. Os venenos de himenópteros sociais apresentam diversidade em peptídeos e proteínas, os quais atuam em processos alérgicos e estão associados a quadros de envenenamento e respostas vasoativas. Nos venenos de vespas sociais, um dos componentes bioologicamente ativos de maior importância dentre os peptídeos, são os desgranuladores de mastócitos, conhecidos como mastoparanos. Dessa forma, com o presente trabalho, objetivou-se em compor a ação do mastoparano Protopolybia MP-III, encontrado da vespa neotropical *Polybia exigua exigua*, em relação ao mecanismo de desgranulação de mastócitos, demonstrando a liberação de mediadores químicos, e a identificação das proteínas envolvidas com o processo alérgico através da análise proteômica e espectrometria de massas. A análise proteômica é caracterizada por ser uma técnica analítica sensível com alto padrão de separação, quando aliada a espectrometria de massas, permite a caracterização de proteínas com grande acurácia. Assim sendo, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas com a utilização de um sistema LCMS-IT-TOF e identificadas somando a totalidade de 622 proteínas, as quais possuíam funções relacionadas ao metabolismo de adesão celular, apoptótico, autoproteção, endocítico, exocítico, “house keeping”, metabolismo energético, proteassoma, função mastocitária, reorganização do citoesqueleto e transdução de sinal. O desenvolvimento deste projeto foi realizado através de uma abordagem proteômica *shotgun*, o qual corroborou para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação do mastoparano Protopolybia MP-III, bem como, o entendimento dos processos inflamatórios causados pela toxina após os frequentes acidentes.

Palavras-chave: Análise proteômica *shotgun*. Mastócito. Mastoparano.

ABSTRACT

During the last decades, the Secretariat of Health Surveillance reports the growing number of accidents caused by bees and wasps. The venoms of social Hymenoptera diversity present in peptides and proteins, which act in allergic processes and frameworks, are associated with poisoning and vasoactive responses. In venoms of social wasps, one of the biologically active components greater importance among the peptides are degranulate mast cells, known as mastoparanos. The present work aimed to compose in the action of mastoparan Protopolybia MP-III, found the wasp neotropical *Polybia exigua exigua* in relation to the mechanism of degranulation of mast cells, demonstrating the release of chemical mediators, and the identification of allergenic proteins involved with the process by proteomic analysis and mass spectrometry. The proteomic analysis is characterized as a sensitive analytical technique with high standard of separation, when combined with mass spectrometry, allows the characterization of proteins with high accuracy. Then, the samples were analyzed by mass spectrometry with the use of a system LCMS-IT-TOF and identified by summing the total of 622 proteins which had metabolism-related cell adhesion, apoptosis, self protection, endocytic, exocytic functions, house keeping, energy metabolism, proteasome, mast cell function, cytoskeletal reorganization and signal transduction. The development of this project was conducted through a *shotgun* proteomics approach, which corroborated to a better understanding of the mechanisms of action of mastoparan Protopolybia MP-III as well as the understanding of inflammatory processes caused by the toxin after frequent accidents.

Keywords: *Shotgun* proteomic analysis. Mast cell. Mastoparan.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Os insetos da Ordem Hymenoptera	10
2.2 A vespa <i>Protopolybia exigua exigua</i>	11
2.3 Acidentes com Hymenoptera sociais	12
2.4 Alergias aos venenos de Hymenoptera	14
2.5 Imunoterapia ao Veneno de Hymenoptera	15
2.6 Composições do veneno de vespas	Erro! Indicador não definido.
2.6.1 Proteínas, peptídeos, e compostos de baixa massa molecular	16
2.7 Peptídeo desgranulador de mastócito, <i>Protopolybia</i> MP-III	20
2.7.1 <i>Protopolybia</i> MP-III	20
2.8 Mastócitos	21
2.8.1 Aspectos celulares e moleculares dos Mastócitos	21
2.8.2 Ativação dos mastócitos mediada pela ligação FcεRI	23
2.9 Análise proteômica	24
2.9.1 Proteômica por abordagem <i>shotgun</i>	25
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Preparo de amostra	28
4.2 Experimentos de LCMS-IT-TOF-MS	29
4.3 Bioinformática proteômica	29
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO	31
5.1 Grupos amostrais e Classes biológicas	31
5.2 Identificações das proteínas	33
5.3 As proteínas de função mastocitária	76
5.4 Perfil geral do proteoma funcional mastocitário	82
5.5 Vias regulatórias que são ativados pelo mastoparano MP-III em mastócitos	85
6 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE A – Imunoglobulinas identificadas	100

1 INTRODUÇÃO

Os venenos de vespas sociais são constituídos por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, compostos de baixa massa molecular, os quais são responsáveis por dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas e sistêmicas. Os componentes alergênicos encontrados nos venenos de vespas apresentam a propriedade de sensibilizar o sistema imune e ativar a produção de anticorpos com alta especificidade, assim sendo, quando na presença de um antígeno específico o paciente desenvolve os sintomas característicos do processo alérgico (KRISHNASWAMY; AJITAWI; CHI, 2006, p. 13-34).

A prevalência de sensibilização de humanos aos venenos de Hymenopteras 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 (ANTONICELLI; BILO; BONIFAZI, 2002, p. 341-346). Nos venenos de vespas sociais, um dos componentes biologicamente ativos de maior importância dentre os peptídeos, são os desgranuladores de mastócitos, conhecidos como mastoparanos (PAWSON; NASH, 2000, p.1027-1047). Os mastócitos atuam nas reações inflamatórias e alérgicas através da liberação de uma variedade de compostos biologicamente ativos como histamina, proteases neutras, prostaglandinas, leucotrienos, cininas e quimiocinas B2 (SANTOS et al., 2012, p. 2682–2693).

A ação de peptídeos tóxicos, quimiocinas, mediadores locais, neuropeptídeos, fatores de agregação plaquetária, citocinas, fatores de crescimento, proteoglicanos e mastoparanos exercem respostas celulares através da ligação aos receptores de membranas acoplados às proteínas G, ativando-as ou inibindo-as (CRIVELLATO et al., 2004, p. 259-270). Os peptídeos desgranuladores oriundos de venenos animais são responsáveis pela ativação celular via proteínas G, podendo se associar a ocorrência de uma série de manifestações farmacológicas, inflamatórias e imunopatológicas nas vítimas ferroadas pelas vespas sociais. Os mastócitos desempenham eminente função na fisiopatologia da alergia, assim como são atuantes em processos pró-inflamatório e na mediação de imuno- reguladores (KRAFT; KINET 2007, p. 366-371).

Sendo assim, foi estudada a ação do mastoparano Protopolybia MP-III oriundo da vespa social *Protopolybia exigua exigua* e que é capaz de interagir com diferentes tipos de alvos moleculares, sem causar lise celular. Quando na presença dos mastócitos, o veneno provoca intensa atividade exocitótica e eventos secretores, o que pode pronunciar os quadros de inflamação e dor como consequência da liberação de grânulos, bem como mediadores os pré-formados, os sintetizados e os recém-sintetizados (MARCHINI, 2008, p. 2-4). A intensa atividade exocitótica é oriunda a partir da ativação da subunidade α da proteína G pertencente ao complexo GPCR. Contudo, a interação e mediação dos fatores não são plenamente contempladas pela explicação por este modo da ativação comumente conhecido (SANTOS et al., 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os insetos da Ordem Hymenoptera

A ordem Hymenoptera abrange aproximadamente 200.000 espécies de abelhas, vespas e formigas, ocupando os mais variados tipos de ambientes disponíveis, estima-se que existam pelo menos 250.000 espécies no mundo. A ordem Hymenoptera é considerada a quarta maior em número de espécies, sendo a mais especiosa entre os insetos (VETTER; VISSCHER, 2008, p. 481-496). Os membros pertencentes a esta ordem desenvolveram glândulas especializadas na produção de veneno e a estruturação de um ferrão, os quais podem ser usados tanto na busca por presas quanto em sua própria defesa (STEEN et al., 2005, p. 91-94).

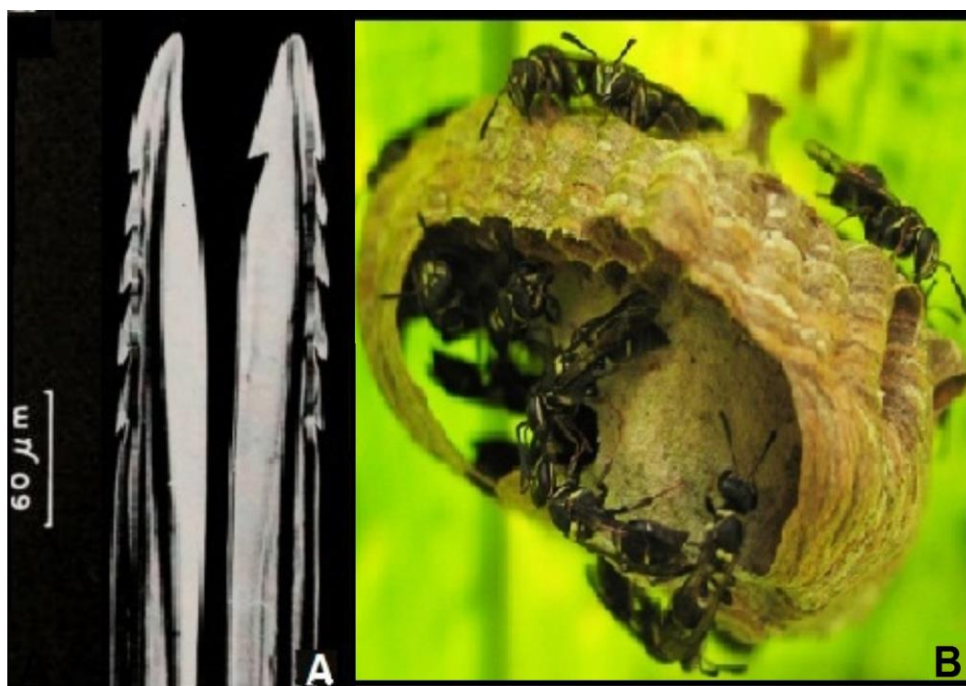
Os insetos da ordem Hymenoptera podem ser classificados em dois grupos de acordo com sua história evolutiva: social e solitário. Do ponto de vista etológico, os himenópteros solitários desenvolveram um veneno especializado na paralisação das presas, deste modo, garantindo sua alimentação. Já os himenópteros sociais utilizam o seu aparelho de ferroar somente para defesa ativa, visando manter distantes os animais que ameaçam a estabilidade da colônia (EVANS; EBERHARD, 1970, p.265).

Os insetos da ordem Hymenoptera pertencente à subordem Apócrita e infraordem Aculeata tiveram uma modificação na estrutura do ovopositor que se tornou um ferrão para injetar veneno. Baseado na biologia e comportamento desses himenópteros, o veneno e o aparelho de ferroar sofreram alterações ao longo dos tempos, evoluindo para melhor adaptação de cada espécie (PALMA, 2006, p. 389-396). O aparelho de ferrão está dividido em duas partes: a parte anterior formada por uma estrutura muscular e quitinosa, responsável na introdução do ferrão e a injeção do veneno; e a parte posterior constituída por uma porção glandular, a qual está associada à produção e ao armazenamento do veneno.

O veneno produzido nas glândulas secretoras está armazenado no reservatório sob a forma de precursores, sendo apenas ativados posteriormente (SANTOS, 2007, p. 5-9). Como por exemplo, as proteínas *heat shock* 60, 70 e 90 que estão relacionadas ao metabolismo das chaperoninas. A presença destas proteínas no veneno da vespa social *Polybia paulista* representa uma estratégia para manter as toxinas importantes do veneno na forma inativa, enquanto armazenadas no reservatório, antes da ferroadada na vítima. No entanto, sua ação somente se exerceria instantes antes da inoculação do veneno, ativando tais proteínas (SANTOS, 2007, p. 47).

Os aculeatas são compostos por 50 mil espécies, sendo representados por: Formicidae com 10 a 15 mil espécies, Apidae com 10 mil e as demais espécies compõem a família Vespidae (CHAUD; GOBBI; MALASPINA, 1994, p. 173-193). As vespas estão divididas em três superfamílias: Chrysidoidea, Apoidea e Vespoidea. A superfamília Vespoidea é composta por seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, das quais três são encontradas no Brasil (Masarinae, Eumeninae e Polistinae). A subfamília Polistinae é representada por três tribos: Polistini, Epiponini e Mischocyttarini, sendo a tribo Epiponini constituída por 20 gêneros e 216 espécies, dentre as quais está localizada a espécie *Protopolybia exigua exigua* (CASTRO; PALMA, 2009, p. 230). A figura 1 abaixo evidencia o aparelho de ferroar (figura 1A) da vespa *P. exigua exigua* bem como a colônia e os indivíduos da vespa social (figura 1B).

Figura 1- Morfologia do indivíduo e estrutura da colônia



Fonte: (A) PALMA; GOBBI (1997, p. 152-162) Morfologia do aparelho de ferroar de *P. exigua exigua* que possui lancetas quitinosas. (B) LOPES (2013) Colônia constituída por camadas de celulose e que muitas vezes se instala próximo a regiões urbanas, além da morfologia dos indivíduos operário da espécie *P. exigua exigua*.

2.2 A vespa *Protopolybia exigua exigua*

A vespa *P. exigua exigua* possui ampla distribuição por quase toda a região Neotropical e no Brasil a sua ocorrência abrange 15 estados (Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará,

Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo). Nestes locais endêmicos, a vespa é mais comumente conhecida por exu-de-cachorro devido ao comportamento agressivo ao defender seu ninho de possíveis invasores. (NETO, 2013, p. 237-251). Ao proteger a sua colônia, estes indivíduos ferroam as vítimas introduzindo substâncias citotóxicas, o que pode causar desde leves injúrias ou então em casos mais graves ocasionar o óbito (SOUZA et al, 2009, p. 1387-1395).

O primeiro favo dos ninhos *P. exigua exigua* é do tipo pedunculado e envelopado e os demais são construídos diretamente sobre o envelope dos favos anteriores. As operárias apresentam longevidade média de $25,6 \pm 16,8$ dias, com maior taxa de mortalidade entre 6-10 e 11-15 dias, que são os intervalos que correspondem ao início da atividade forrageadora. A duração do subestágio de ovo de *P. exigua exigua*, a 27 °C é de 3 a 5 dias, o de larva é de 18 a 20 dias e pupa de 20 dias, totalizando da eclosão do ovo até a emergência (a saída do adulto) 41 a 45 dias (ROCHA; GIONNOTTI, 2007, p. 813-833).

As vespas pertencentes à tribo Epiponini possuem caracteristicamente várias rainhas poliginia, e apresentam castas morfologicamente incipientes até distintas e a eventual presença de formas intermediárias de fêmeas não inseminadas, que apresentam ovários desenvolvidos, sendo este conjunto de características importante no estudo da evolução do comportamento social (WENZEL, 1991, p. 677).

Por meios de observações comportamentais de indivíduos de *P. exigua exigua*, indicou-se a existência de três castas: as operárias, que desempenham as funções de campeiras, fornecendo material de construção e por vezes, defendendo o ninho; casta intermediária, com indivíduos responsáveis pela edificação do ninho e atividades de campeiras (na obtenção de néctar e presas maceradas), além do cuidado com a cria e podendo também ter a função de poedeiras na produção de machos. E por fim a rainha, que além de sua função de postura, pode também inspecionar células em edificação (ROCHA; GIONNOTTI, 2007, p. 813-833).

2.3 Acidentes com Hymenoptera sociais

Dentre as vespas que causam acidentes, encontram-se principalmente relatos com a vespa social *P. paulista*, conhecida popularmente como “paulistinha”, que é encontrada predominantemente no estado de São Paulo, mas também ocorre em Goiás, Mato Grosso, Paraná, e Minas Gerais, além de estar presente em outros países como o Paraguai. Por instalarem-se em áreas urbanizadas, é alta a frequência de acidentes

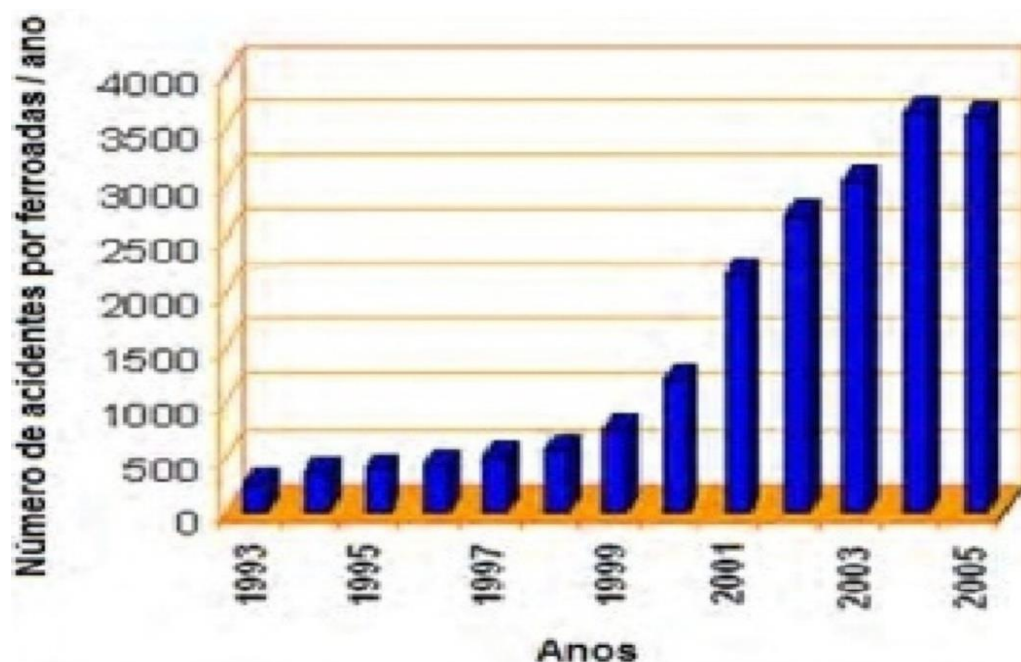
causados por seu comportamento agressivo ao defender suas colônias (CARPENTER et al., 2008, p.3-10). Apesar do grande número de espécies de vespas sociais endêmicas das regiões tropicais e subtropicais como a *P. exigua exigua*, que é uma vespa agressiva e que provoca freqüentes acidentes, pouco se conhece sobre a composição do veneno desses insetos, limitando o conhecimento e criando muitas dificuldades para lidar com o cuidado adequado dos pacientes após acidentes com estas vespas (SOUZA et al, 2009, p. 1387-1395).

Em um levantamento de acidentes com himenópteros registrado no Hospital das Clínicas em São Paulo, foi observado que as vespas eram responsáveis por aproximadamente 32,6% dos acidentes, seguidas das abelhas com 28,2% e das formigas 26,8% (PINTO, 2011, p. 26-30). Na Europa, foram realizados estudos analisando o perfil de pessoas sensibilizadas ao veneno, demonstrando que 20% das vítimas apresentavam sintomas alérgicos locais; 15%, reações sistêmicas e 17% eram assintomáticas, entretanto estas eram positivas para testes de IgE específica (NITTER et al., 2004, p. 324-329).

A Secretaria de Vigilância em Saúde relata que nas últimas décadas, no Brasil e em toda a América é crescente o número de acidentes por himenópteros sociais. Além disso, os processos alérgicos estão associados aos quadros de acidentes, envenenamento e óbitos, sendo que estes ocorrem em maioria no gênero masculino 63% (3.524/5.605), na zona urbana 65% (3.660/5.605) e na faixa etária de 20 a 49 anos, 48% (2.711/5.605).

Dados fornecidos pelo site oficial da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo demonstram que no período de janeiro a julho do ano de 2012 foram registrados 1.291 acidentes dos quais quatro evoluíram a óbito (SÃO PAULO, 2012). Em média, seis paulistas são atendidos diariamente em hospitais vítimas de ataques de enxames, segundo dados informados pelos municípios ao Centro de Vigilância Epidemiológica. Entre as regiões com o maior número de pessoas acidentadas estão Campinas e Piracicaba, ambas com 218 notificações, seguidas de Botucatu, com 118 casos e Araraquara, com 114 notificações. Em 2011, o número de notificações no Estado chegou a 2.080 de janeiro a dezembro, com três mortes. O gráfico 1 apresenta os dados fornecidos até o ano de 2005 pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo que demonstram aumento no número de acidentes ocasionado pelas ferroadas de vespas e abelhas no estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2012).

Gráfico 1 - Número de acidentes por ferroada/ ano entre 1993 e 2005



Fonte: SÃO PAULO (2012) O gráfico representa o número de acidentes (ferroadas/ ano) no período de 1993 a 2005.

2.4 Alergias aos venenos de Hymenoptera

Os venenos de himenópteros sociais apresentam enorme diversidade de peptídeos e proteínas, os quais são capazes de induzir citotoxicidade e respostas vasoativas. A prevalência de sensibilização por esses compostos está estimada entre 9,3% e 28,5% na população mundial (ANTONICELLI; BILO; BONIFAZI, 2002, p. 341-346), sendo descritos altos índices de acidentes por ferroada.

Os indivíduos sensibilizados, quando ferroados, podem vir a óbito decorrentes de anafilaxias, estas são ocasionadas devido ao desenvolvimento de imunoglobulinas específicas (IgE) para os diversificados componentes do veneno (REISMAN; LIVINGSTON, 1989, p.331-337), e é caracterizada pela diminuição da pressão arterial, taquicardia, estresse respiratório, desmaio, acompanhada ou não de edema da glote, sendo sua expressão maior denominada de choque anafilático.

As reações alérgicas são decorrentes da hipersensibilidade aos venenos dos himenópteros, possuindo respostas imunológicas classificadas por sua atuação molecular, categorizadas deste modo: imediata, citotóxica, participação de imonucomplexos e por reações advindas da composição química do veneno. Assim sendo, a resposta conhecida como (1) imediata é caracterizada pela participação de IgE

específicas na ativação da reação alérgica. Dessa forma, os componentes do veneno podem ativar células mastocitárias, estas quando desgranuladas liberam mediadores químicos intensificando a reação alérgica, muitas vezes, são esses os casos relacionados à anafilaxia. Já a resposta (2) citotóxica há a participação de anticorpos IgG e IgM contra antígenos da superfície celular ou da matriz celular. Na atuação dos (3) imunocomplexos circulantes, as moléculas IgG e IgM com os antígenos podem se concentrar em áreas vasculares ativando o sistema imunológico complemento (CASTRO, 2001, p. 132).

As reações ocasionadas pelas ferroadas atuam no sistema imunológico, bem como localmente ou na via sistêmica. Os eventos clínicos subsequentes são tais como pruridos locais, urticária, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais, perda de memória e tontura, dificuldade de respirar, espirros, edema de glote, contração do pulmão, displasia e asma, dor de cabeça, calafrio e febre. As reações sistêmicas são os quadros mais agravantes, os quais envolvem hipotensão, arritmia, bronco espasmo, paradas cardiorrespiratórias e morte do paciente (FREEMAN, 2004, v. 351, p.1978-1984).

2.5 Imunoterapia ao Veneno de Hymenoptera

O uso dos venenos de himenópteros para diagnósticos e tratamento de reações alérgicas provocadas por acidentes com estes insetos foram estabelecidos inicialmente no final dos anos 70. A especificidade da imunoterapia obteve resultados efetivos em pacientes alérgicos, os quais 453 pacientes sensíveis foram expostos ao veneno e submetidos paralelamente com um tratamento de imunoterapia específica, comprovando significativas reduções na taxa de reações sistêmicas.

A dessensibilização do paciente consiste em administrar quantidades gradativas de alérgenos, no qual o paciente é sensível, de modo a produzir um estado de tolerância imunológica (JOHANSSON; HOURIHANE; BOUSQUET, 2001, p.216-225). Nos tratamentos imunoterápicos, são injetados nanogramas a microgramas de veneno bruto, estabelecendo um aumento do nível de IgG e diminuição do nível de IgE no indivíduo alérgico. A imunoterapia resultou em uma notável estratégia clínica para melhoria na qualidade de vida dos pacientes alérgicos ao veneno de vespas após a técnica de dessensibilização, além de contribuir no entendimento do mecanismo de tolerância das células T reguladoras em indivíduos saudáveis, baseando-se em altas doses à exposição do veneno de abelhas em apicultores (PEREIRA et al., 2005, p.273-278).

A imunoterapia reduz o risco de reações sistêmicas após ferroadas de insetos em pacientes sensibilizados, com eficácia de 95 a 97%. No entanto, o diagnóstico de alergias a insetos sociais é elaborado com extratos brutos, os quais possuem composição muito complexa, além de estarem submetidos a fatores naturais como degradação das proteínas e heterogeneidade da origem dos alérgenos, podendo representar problemas durante os diagnósticos da alergia e no processo da imunoterapia (CASTRO, 2001, p. 132). Além disso, as reações colaterais causadas pelo uso do veneno levaram a normas rígidas quanto à utilização mais generalizada deste tratamento (PEREIRA et al., 2005, p.273-278).

O estudo da imunoterapia é determinante no diagnóstico de doenças alérgicas, principalmente no que tange o veneno de vespas, de tal modo que os alérgenos de diferentes venenos podem apresentar semelhanças conformacionais de epítomos, tendo como consequência a reatividade cruzada. Nos últimos anos, surgiu o interesse em tentar controlar alergias através de vacinas constituídas por peptídeos. As vacinas peptídicas são benéficas não só por induzirem respostas bem definidas do sistema imune, mas também por serem sintetizadas com alta reprodutibilidade, excelente grau de pureza e em grandes quantidades (WANG et al., 2003).

Em 2011 foi relada pela primeira vez, dentre os himenópteros sociais, a caracterização de um epítomo linear de células-B imunoreativo a IgE humano, bem como a identificação de outros nove epítomos imunoreativos a IgG humano, ambos provenientes do veneno de *P. paulista*. Com a determinação da estrutura tridimensional do antígeno-5, foi possível mapear tridimensionalmente os epítomos lineares de células-B identificados. Dessa forma, as sequências peptídicas podem ser selecionadas em uma proteína, eliminando os fragmentos potencialmente responsáveis pelos efeitos indesejados da imunoterapia clássica (PINTO, 2011, p. 97).

2.6 Composições do veneno de vespas

2.6.1 Proteínas, peptídeos, e compostos de baixa massa molecular

Os venenos de vespas sociais são constituídos por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, e compostos de baixa massa molecular os quais são responsáveis pelas dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas e sistêmicas (PALMA, 2006, p. 409-417). Atualmente, existe um crescente interesse em relação aos componentes químicos dos venenos, principalmente na área da imunologia clínica. Os componentes

alergênicos encontrados nos venenos de vespas apresentam a propriedade de sensibilizar o sistema imune e ativar a produção de anticorpos com alta especificidade, assim sendo, quando na presença de um antígeno específico o paciente desenvolve os sintomas característicos do processo alérgico (SANTOS, 2007, p. 12-13).

As principais proteínas presentes nos venenos de vespas são as fosfolipases, hialuronidases, antígenos-5 e serino-proteases. As proteínas possuem geralmente elevada massa molecular que, ao serem injetadas durante o ato de ferroar, iniciam uma resposta imune (SANTOS et al., 2011, p. 365-369).

A fosfolipase possui a função de hidrolisar os fosfolipídios de membranas biológicas, formando poros e causando posteriormente, lise celular (ROCHA, 2008 p.6-7). Essa atuação hidrolítica é auxiliada pelas atividades de proteínas lipásica, esterásica e fosfatásica (SOUZA et al, 2009, p. 1387-1395). Dentre os himenópteros, as fosfolipases foram bioquimicamente caracterizadas em *Apis melífera*, e em alguns venenos de vespas neotropicais, tais como *Vespula arenaria*, *Vespula vulgaris* e *Vespula maculata* conhecidas como Polibitoxinas -I, -II, -III e -IV, bem como a vespa *Agelaia Palipes palipes* e sua toxina Agelotoxina (COSTA; PALMA, 2000, p.1367-1379).

A hialuronidase é uma glicoproteína de 45 kDa constituída de um grupo polissacarídeo de alta massa molecular e também é um alérgeno encontrado no veneno da vespa *P. paulista* (JACOMINI et al., 2013, p. 70-80). Esta proteína se localiza no interstício celular e garante a adesão celular e um grupo enzimático que hidrolisa o ácido hialurônico facilitando a difusão dos componentes do veneno para o interior das células (KOLARICH et al., 2005) . A determinação estrutural e tridimensional da proteína foi descrita por (SKOV et al., 2006) utilizando cristalografia de raio X, e apresentou 324 resíduos de aminoácidos e possivelmente de quatro a cinco sítios de glicosilação.

O antígeno-5 está presente em diferentes venenos de diferentes espécies de vespas sociais, possuindo função biológica desconhecida, porém, é associado aos processos alérgicos (PINTO, 2011, p. 31-33). A estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno de *V. vulgaris* foi determinada por cristalografia de raios-X, revelando que a mesma apresenta 5 hélices e 4 folhas- β (HOFFMAN, 2006, p. 109-128). A estrutura monomérica é composta por 207 resíduos de aminoácidos e massa molecular em torno de 23 KDa com 8 resíduos de cisteína, formando 4 pontes de dissulfeto e ponto isoelétrico acima de 9. A estrutura secundária contém 22% de hélices 22% de folhas- β e

56% entre estruturas dobradas e estruturas aleatórias (turn e coil). Os antígenos-5 de várias espécies de *Vespula* apresentam 95% de identidade em suas seqüências primárias, no entanto, há 58-67% de identidade entre as espécies do gênero *Dolichovespula* e *Polistes*, respectivamente (PINTO, 2011, p. 30-33). Essa porcentagem é responsável por promover a reatividade cruzada com as espécies do gênero *Vespula*, enquanto que entre alguns gêneros da família Vespidae, ocorre uma baixa reatividade cruzada (JACOMINI et al., 2014, p. 104-111).

A serino-protease foi identificada nos venenos de *Polistes dominulus* e *Polistes exclamans*, e atualmente existem três serino-proteases isoladas do veneno de *Bombus pennsylvanicus* e do veneno das vespas europeias *P. dominulus* e *P. exclamans*, as quais demonstraram um elevado grau de resíduos conservados em suas seqüências primárias. Além do mais, apresentaram atividades significativas de respostas a IgE específica (WINNINGHAM et al., 2004, p.928-933).

A fosfatase ácida (Api m3) foi seqüenciada 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 função antigênica ainda é desconhecida (HOFFMAN, 2006, p. 109-128).

A reatividade cruzada do veneno da vespa *P. paulista* foi demonstrado nas proteínas de fosfolipase A1, antígeno-5 e hialuronidase com os venenos da vespa *Agelaia pallipes pallipes* e da abelha *A. mellifera*, no qual o antígeno-5 se mostrou altamente imunorreativo (SANTOS, 2007, p. 12-13).

Os pacientes alérgicos a venenos de vespas podem apresentar reações para mais de um veneno de vespa devido à similaridade entre suas seqüências primárias, uma vez que os anticorpos são produzidos contra regiões altamente conservadas (BROCHETTO-BRAGA, 2013, p. 2). A importância dos estudos na reatividade cruzada entre os venenos de insetos está representada nas áreas clínicas, pois estas interações possuem impacto direto sobre o diagnóstico e melhor conduta terapêutica (CASTRO, 2001, p. 132).

Já os peptídeos encontrados nos venenos apresentam características anfipáticas, policatiônicas, as quais contribuem para a ocorrência de intensos processos inflamatórios. Dentre as classes dos peptídeos, destacam-se os mastoparanos, peptídeos quimiotáticos, cininas e silverina (PALMA, 2006, p. 389-396).

Os mastoparanos são peptídeos normalmente policatiônicos e hidrofóbicos devido a presença de vários resíduos de leucina, isoleucina e alanina, na seqüência deste

tipo de peptídeo, que pode apresentar ainda alguns resíduos de lisina (NAKAJIMA, 1986, p. 309-327). O primeiro mastoparano desgranulador de mastócitos, e hemolítico, foi descrito em 1979 oriundo de *Vespa lewisii* (HIRAI et al.; 1979, p. 1942-1944).

Os mastoparanos promovem a lise celular através da formação de poros nas membranas celulares a qual tem sua permeabilidade aumentada através da perturbação nas bicamadas lipídicas, e/ou então, os mastoparanos interagem com receptores acoplados às proteínas G, iniciando a ativação de mecanismos celulares relacionados à desgranulação (MENDES et al., 2004, p. 636–642). Os resultados demonstraram que o peptídeo mastoparano Polybia-MPII causa danos profundos na ultraestrutura das fibras musculares esqueléticas, a desorganização estrutural e contrátil, originadas através do sarcolema, seguido de alterações nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático (ROCHA et al.; 2010, p. 1213-1221).

Os peptídeos quimiotáticos são caracterizados por serem tridecapeptídeos, policatiônicos e podem induzir quimiotaxia em leucócitos polimorfonucleares e em macrófagos (NAKAJIMA, 1986, p. 309-327).

Os peptídeos conhecidos como cininas são polipeptídeos de 9-18 resíduos de aminoácidos, os quais possuem suas seqüências primárias homólogas às bradicininas, com algumas exceções, na qual ocorre uma substituição dos resíduos de aminoácidos nas posições três e seis na seqüência da bradicinina. As cininas podem atuar na constrição muscular e desgranulação de mastócitos (SAIDEMBERG, 2011, p. 22-23).

Os peptídeos denominados como silverinas são peptídeos policatiônicos e anfipáticos, possuindo 21 a 25 resíduos de aminoácidos e apenas uma ligação covalente dissulfeto. Atuam como potentes desgranuladores de mastócitos, todavia não apresentam atividade hemolítica conhecida (BAPTISTA et al., 2010, p. 880-889).

Os peptídeos designados por taquicininas possuem uma seqüência C-terminal do tipo: Fe-X-Gli-Leu-Met-NH₂. Apresentam capacidade de provocar rápida contração nas vísceras dos animais (PISANO, 1979, p. 273-285).

Os compostos de baixas massas moleculares atuam como agonistas e/ou antagonistas de canais iônicos, capazes de modular a neurotransmissão em insetos-presa levando-os à paralisia. Os compostos de baixas massas moleculares identificados em venenos de vespas são: histamina, octopamina, GABA, espermidina, espermina, serotonina, lisina, arginina, acetilcolina, dopamina, nicotina, tiramina, adenosina, alanina, ácido glutâmico, putrescina, cadaverina, adrenalina, noradrenalina, além de outros compostos (SAIDEMBERG, 2009, p. 24-33).

2.7 Peptídeo desgranulador de mastócito, Protopolybia MP-III

2.7.1 Protopolybia MP-III

A ação de peptídeos tóxicos, quimiocinas, mediadores locais, neuropeptídeos, fatores de agregação plaquetária, citocinas, fatores de crescimento, proteoglicanos e mastoparanos exercem respostas celulares através da ligação aos receptores de membranas acoplados às proteínas G, ativando-as ou inibindo-as. Esses tradutores altamente especializados modulam a atividade de múltiplas rotas de sinalização conduzindo a diversas respostas biológicas (PAWSON; NASH, 2000, p.1027-1047).

Nos venenos de vespas sociais, um dos componentes biologicamente ativos de maior importância dentre os peptídeos, são os desgranuladores de mastócitos, conhecidos como mastoparanos. Estes tetradecapeptídeos ricos em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, como leucina, isoleucina e alanina, que também apresentam lisinas em suas sequências primárias, encontradas normalmente nas posições quatro, onze e doze da molécula, constituem o maior grupo de peptídeos em venenos de vespas sociais. Demonstrou-se que os mastoparanos que possuem resíduos de lisina em suas cadeias, são capazes de facilitar a liberação de histamina nos mastócitos (HIGASHIMA et al., 1988, p.6491-6494).

A caracterização bioquímica do veneno de *P. exigua exigua* corrobora para uma maior compreensão dos mecanismos de ação do veneno, assim sendo, três peptídeos do grupo dos mastoparanos foram identificados e denominados por Protopolybia MP-I, MP-II e MP-III, dos quais os mastoparanos MP-II e MP-III foram caracterizados como desgranuladores de mastócitos, e não hemolíticos pela ligação aos receptores de proteínas G localizados nas membranas plasmáticas celulares (MENDES et al., 2004, p. 636–642). Estudos demonstram que o desencadeamento da resposta de desgranulação está relacionado diretamente com a ativação de proteínas G inibitórias, através dos receptores B1 e B2 (SANTOS et al., 2012, p. 2682–2693).

Comparações realizadas entre os peptídeos Melitina (peptídeo isolado do veneno de abelha) e Mastoparano (peptídeo isolado do veneno de vespa) demonstram diferenciados mecanismos de ação dos venenos. A Melitina interage somente com os fosfolipídios de membrana, enquanto que os Mastoparanos interagem com o receptor de membrana acoplado à proteína G, promovendo a desgranulação de mastócitos (SAIDEMBERG, 2011, p. 28-30). A partir da liberação de mediadores químicos, estes

atuam nos fosfolipídios de membrana em interação com as fosfolipases (ARGIOLAS; PISANO, 1983, p. 13697-13702).

A interação dos mastoparanos com os fosfolipídeos pode causar perturbações na organização estrutural das membranas, além do mais, eles se ligam aos receptores específicos acoplados às proteínas-G, ativando o mecanismo de transdução de sinal, que envolve a troca GTP/GDP (HIGASHIMA et al., 1988, p.6491-6494).

A interação entre o mastoparano e a membrana celular plasmática se dá pela exposição à fase aquática de aproximadamente três ou quatro resíduos do aminoácido Lisina, enquanto a parte hidrofóbica da molécula penetra por entre as camadas lipídicas. Assim sendo, as moléculas do peptídeo mastoparano se acumulam na metade exterior da bicamada, causando a desestabilização das cadeias alquílicas nos fosfolipídeos da bicamada celular em lipossomos neutros, o que possibilita que os peptídeos penetrem rapidamente por entre a membrana (SILVA, 2009, p. 29-31).

A análise da sequência do peptídeo Protopolybia MP III, mostrou que este peptídeo apresenta cerca de 42% da sua estrutura secundária em conformação α -helicoidal e sequência primária correspondente a I-N-W-L-K-L-G-K-A-V-I-D-A-L-NH₂. A presença da carga positiva no resíduo C-terminal, assim como no resíduo de Lisina, e conformação α -helicoidal são requisitos para o efeito estimulante de mastoparanos na interação com a proteína G de membrana, na subunidade de guanilato ciclase (SANTOS et al., 2012, p. 2682–2693).

2.8 Mastócitos

2.8.1 Aspectos celulares e moleculares dos Mastócitos

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea, oriundos especificamente de células pluripotentes hematopoiéticas (RECH; GRAÇA, 2006, p. 50-61). Os precursores de mastócitos são células AA4 + / BGD6 + AA4 + / BGD6 + (JAMUR et al., 2001, p. 219-228). Estas células progenitoras não possuem grânulos secretores e expressam receptores transmembranares como CD13, CD33, CD38, CD34 e c-kit (KIRSHENBAUM, 2000, p. 497-516).

Os mastócitos estão localizados no tecido conjuntivo, associados a vasos e nervos e em áreas de potencial entrada de substâncias estranhas. Participam dos mecanismos de defesa do organismo e estão envolvidos em reações imunes locais, reações de hipersensibilidade imediata, reações inflamatórias, eliminação de parasitas e

na imunidade inata contra infecções bacterianas (KRISHNASWAMY; AJITAWI; CHI, 2006, p. 13-34).

Os mastócitos migram através do sangue para os tecidos periféricos completando seu processo de amadurecimento sob influência de fatores teciduais (JAMUR et al., 2001, p. 219-228).

Nos tecidos, os mastócitos se diferenciam em dois subgrupos quanto à sua estrutura, bioquímica e função: os mastócitos da mucosa (MM) e os do tecido conjuntivo (MTC). Os MM expressam predominantemente triptase e estão próximos às células linfocitárias T-helper 2. Os MTCs, entretanto, expressam mais triptase, quimase, carboxipeptidase e catepsina G, predominam no trato gastrointestinal, pele, e tecido subcutâneo (RECH; GRAÇA, 2006, p. 50-61). Juntamente com os basófilos originados na medula óssea, expressam grande afinidade pelos receptores da imunoglobulina E, e o complexo FcεRI, além de apresentarem anafilotoxinas semelhantes em resposta imunológica, promovendo a desgranulação. No entanto, diferenciam-se quanto à localização e na morfologia, enquanto os mastócitos situam-se no tecido conjuntivo, em áreas perivasculares, os leucócitos estão na corrente sanguínea e possuem forma arredondada e núcleo irregular bilobado (CHEN; EXTON, 2004, p. 22076-22083).

A morfologia celular dos mastócitos é dependente da localização, apresentam-se alongados quando aderidos nos tecidos conjuntivos, e quando presentes na cavidade peritoneal são arredondados. As principais características celulares dos mastócitos são: um citoplasma repleto de grânulos eletrodensos, microvilos finos na membrana plasmática, núcleo grande, central e arredondado, com dois ou mais nucléolos (DVORAK, 2005, p. 1043-1070).

Os mastócitos estão envolvidos na patogênese de diversas doenças como: asma, artrite reumatóide, aterosclerose, cistite intersticial, doença inflamatória intestinal, esclerose sistêmica progressiva, doenças fibrosantes, cardiopatia isquêmica, quelóides, infecções agudas, doenças cardiovasculares, angioedema, broncoespasmo e colapso cardiovascular (MALUF; BARROS; FILHO, 2009, p. 213-225; RECH; GRAÇA, 2006, p. 50-61).

Após o contato com um antígeno, ocorre imediatamente uma série de eventos bioquímicos, nos quais, os mastócitos movem seus grânulos para a periferia e liberam o conteúdo para o exterior da célula (SANTOS et al., 2012, p. 2682–2693). A resposta posterior à sua ativação é extremamente rápida, produzindo citocinas e mediadores inflamatórios. No entanto, os mastócitos não morrem após a desgranulação, apenas

ficam difíceis de serem identificados devido ao extravasamento de seus grânulos (MARCHINI, 2008, p. 2-4).

O conteúdo liberado pelas células mastocitárias são produtos farmacologicamente ativos, tais como:

a) Fatores pré-formados: são substâncias já previamente estocadas na célula como a histamina, heparina, β -hexosaminidase, proteoglicanas, proteases neutras e algumas citocinas que participam da imunidade, as interleucinas IL-8 e IL-16 e alguns fatores como o TNF- α (Tumor Necrosis Factor), b-FGF (Fibroblast Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), SCF (Stem Cell Factor).

b) Fatores neoformados: estes fatores são oriundos do metabolismo do ácido araquidônico, como a PGD₂ (prostaglandina D₂), leucotrienos como o LTC₄ e LTB₄, PAF (Platelet Activating Factor), e tromboxanas;

c) Fatores recém-sintetizados: a síntese desses fatores ocorre aproximadamente entre 8-12 horas após a desgranulação dos fatores pré-formados, dentre eles destacam-se as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6 e o fator estimulador de colônias granulócitos e macrófago (CRIVELLATO et al., 2004, p. 259-270); (MARCHINI, 2008, p. 2-4).

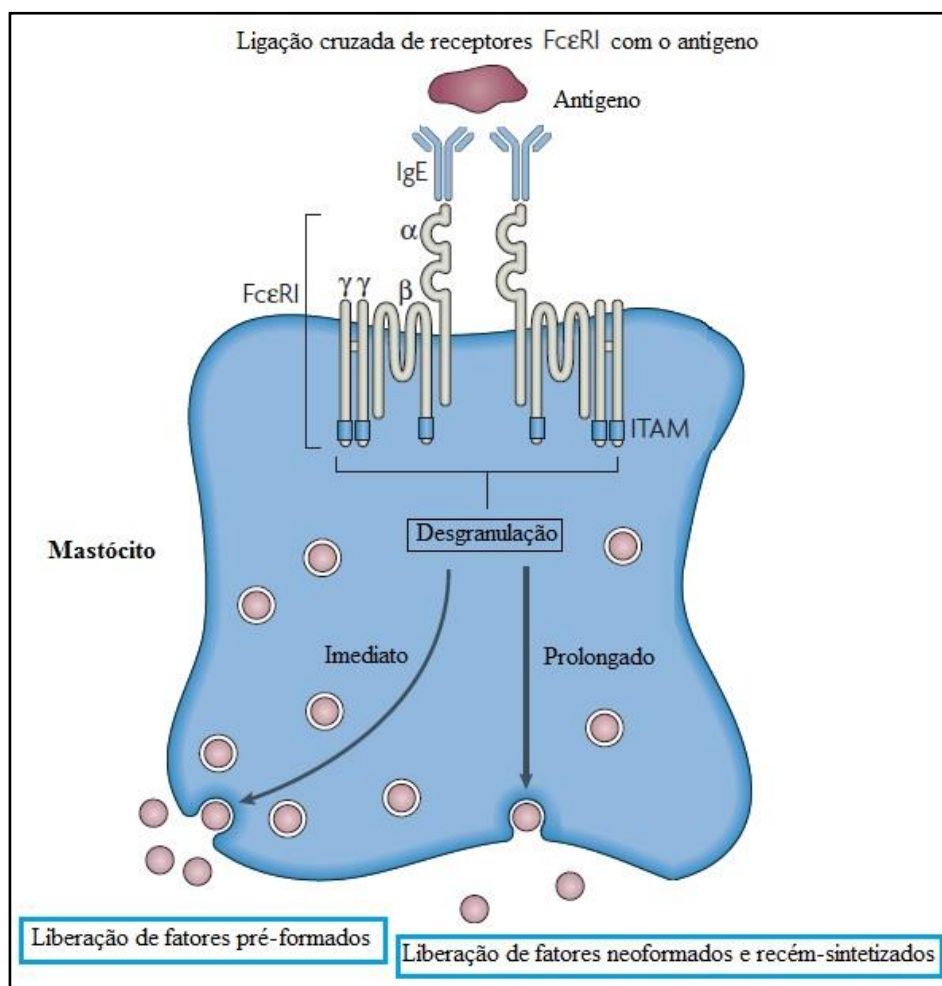
2.8.2 Ativação dos mastócitos mediada pela ligação Fc ϵ RI

A superfície celular dos mastócitos possuem receptores de alta afinidade para a IgE (Fc ϵ RI), que é um complexo tetramérico não-covalente, pertencente a uma família de receptores multicadeia de reconhecimento imune, e é composto por uma subunidade α , responsável pela interação com a porção Fc das IgEs; uma subunidade β e duas subunidades γ unidas entre si por pontes dissulfeto (KRAFT; KINET, 2007, p. 366-371). Sendo que as cadeias β e γ possuem em seu domínio citoplasmático dois resíduos de tirosina localizada em uma região denominada por *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* (ITAM).

A ativação dos mastócitos mediada pela ligação Fc ϵ RI somente ocorre quando os antígenos multivalentes ligam-se à porção Fab das IgEs, que por sua vez já estão ligadas no receptor (RECH; GRAÇA, 2006, p. 50-61) (Figura 2). De modo que haja uma ligação cruzada das IgEs e o intercruzamento dos receptores, por fim, desencadeando a desgranulação dos fatores pré-formados e a síntese e liberação dos

fatores neoformados e os recém-sintetizados, conforme sugerido na Figura 3 (SIRAGANIAN, 2003, v. 15, n. 6, 639-946).

FIGURA 2 - Ativação dos mastócitos mediada pela ligação FcεRI



Fonte: Elaborado pelo autor (2014). A forma tetrâmera do complexo (FcεRI) consiste de uma de ligação de IgE da cadeia α com dois domínios da imunoglobulina, uma cadeia β e duas cadeias γ ligadas ao imunoreceptor citoplasmático de tirosina localizados em uma região denominada ITAM. Modelo construído a partir de dados obtidos em KRAFT; KINET (2007, p. 366-371).

2.9 Análise proteômica

O termo proteômica pode ser definido como a interação entre genes e proteínas em uma determinada condição fisiológica, associada a respostas moleculares desse sistema num determinado momento. Assim sendo, as proteínas existentes nas células possuem múltiplas formas, estando sujeitas às modificações em suas estruturas oriundas de processos traducionais e pós-traducionais, essas modificações regulam diversos processos metabólicos, incluindo o processo de degradação que afeta a estrutura da proteína, destinação celular e função (LIEBLER, 2002, p. 1-13).

A tecnologia proteômica pode ser utilizada em análises que demandam acurácia e rapidez nas análises de dados, pois a identificação de alterações genéticas específicas e os perfis protéicos associados como os ocasionados por doenças oferecem diagnósticos precoces e precisos (PLEBANI, 2005, p. 113-122).

A análise proteômica tem sido uma estratégia analítica muito utilizada por utilizar processos sensíveis de separações, identificações e caracterizações de proteínas, permitindo estudos mais completos e abrangentes de fatos biológicos, promovendo enorme avanço científico. Desse modo, é imprescindível a utilização e combinação de métodos sofisticados de análise, como eletroforese bidimensional SDS-PAGE, técnicas cromatográficas, análises de imagens *in situ* e espectrometria de massas (MENEGASSO, 2010, p.11-19).

A abordagem proteômica está associada à melhor compreensão e desenvolvimento de novos fármacos ao elucidar os mecanismos de ativação celular por alérgenos oriundos do veneno de vespas, através do estudo dos receptores acoplados as proteínas de membranas presentes em células do sistema imunológico, como os mastócitos que atuam na defesa do organismo (SANTOS et al., 2012).

2.9.1 Proteômica por abordagem *shotgun*

A designação proteômica *shotgun* está relacionada ao estudo e compreensão de uma mistura complexa de proteínas, através da análise por espectrometria de massas gerando um perfil global de proteínas presentes dentro da mistura (WU; COSS, 2002, p. 242-250). A técnica também pode ser associada à identificação das proteínas menos abundantes, freqüentemente “perdidas” quando utilizados os géis de poliacrilamida (WOLTERS; WASHBURN; YATES, 2001, p. 5683–5690).

A espectrometria de massas pode ser utilizada na investigação estrutural de peptídeos e proteínas, e aliada à cromatografia líquida de alta pressão multidimensional, e aos algoritmos de busca e identificação, é possível obter resultados com velocidade e alta sensibilidade (SEIDLER et al., 2010, p. 634-649).

Os trabalhos de proteômica utilizando-se de técnicas avançadas como LC-ESI-MS permitem identificações rápidas, utilizando-se pequenas quantidades de amostra (STOCKLIN; FAVREAU, 2002, p. 107-123). Assim sendo, a mistura complexa proteica é digerida e os fragmentos peptídicos resultantes são separados por cromatografia líquida e combinadas com espectrômetros de massas de alta resolução,

por fim, as análises tornam-se ainda mais dinâmicas com o uso de ferramentas de bioinformática e de estatística (MENEGASSO, 2012, p. 41-42).

A aplicação da estratégia proteômica shotgun pode ser exemplificada pelo estudo realizado com o veneno da formiga *Solenopsis invicta* Buren. Esta formiga é nativa do território americano, e se caracteriza por ter um comportamento altamente agressivo quando estimulada, causando acidentes de importância médica. Para as análises de espectrometria de massas foi necessário 50 µg do veneno, digerido *em solução* pela enzima Tripsina. Utilizou-se um sistema LCMS-IT-TOF-MS (SHIMADZU) equipado com fonte de ionização electrospray (ESI), que permite a realização de fragmentações sucessivas obtendo-se, assim, tanto espectros MS quanto MS/MS em posterior identificação pelo MASCOT (PINTO et al., 2012, p. 4645-4648, 2012).

Assim como no estudo do veneno, utilizou-se estratégia *shotgun* para a identificação das proteínas relacionadas ao desenvolvimento do Glioblastoma multiforme humano. Os gliomas são os mais malignos dos tumores de cérebro, pois são muito heterogêneos, apresentam características como alta proliferação celular, hiperplasia, áreas necróticas e extensa formação de novos vasos sanguíneos. Para as análises de espectrometria de massas foi necessário 60 µg do tecido comprometido, digerido *em solução* e depois submetido a uma cromatografia de troca catiônica. Empregou-se um sistema ESI-Q-TOF-MS-MS (WATERS) em posterior identificação pelo MASCOT (GIMENEZ et al., 2012, p. 2632-2640).

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como escopo a investigação de alguns dos processos de ativação celular causados pelo peptídeo mastoparano Protopolybia MP-III, envolvido com o mecanismo de desgranulação de mastócitos, e com a liberação de mediadores químicos. Empregou-se a estratégia proteômica *shotgun*, para a identificação das proteínas envolvidas na análise do endoproteoma e do secretoma das células mastocitárias. Visou-se mais especificamente, analisar a translocação dos grânulos, fusão de membrana, bem como a secreção de uma série de mediadores químicos neoformados e recém-sintetizados. O trabalho pretende ainda sugerir algumas etapas para os mecanismos de ação do veneno nos processos inflamatórios causados pela toxina após os freqüentes acidentes.

4 MATERIAIS e MÉTODOS

4.1 Preparo de amostra

Os mastócitos foram extraídos da cavidade peritoneal de 2 ratos Wistar machos pesando 250-300g fornecidos pelo Biotério Central da UNESP-Campus Botucatu. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada com temperatura ambiente de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp - Rio Claro sob número de protocolo 102153/2011-6.

As suspensões foram obtidas pela lavagem da cavidade peritoneal de cada animal, com 15 mL da solução tampão composta por 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 4 mM NaH_2PO_4 , 3mM KH_2PO_4 , 2mM CaCl_2 esterilizada. Foram feitas 2 alíquotas de suspensões concentradas de mastócitos (1×10^6 células / mL): (i) uma incubada na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo sintético Protopolybia MP-III em solução de Acetato de Amônio 10 mM durante 45 minutos a 37°C e (ii) outra alíquota foi apenas incubada na solução de Acetato de Amônio 10 mM durante 45 minutos a 37°C . Em seguida, as suspensões de células foram centrifugadas a $280 \times g$ por 5 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados, e as células ressuspensas em 1 mL de solução de Acetato de Amônio e sonicadas com um transdutor de titânio a 50 Hz por 1 minuto (sônico Dismembrator, Fisher Scientific, modelo 500). As proteínas foram quantificadas pelo método de Hartree - Lowry (1972).

Dessa forma, foram geradas 4 amostras denominadas de:

- I) Endoproteoma de mastócitos NÃO ativados;
- II) Endoproteoma de mastócitos Ativados;
- III) Secretoma de mastócitos NÃO ativados;
- IV) Secretoma de mastócitos Ativados.

Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro Millipore de 10 kDa e solubilizadas em tampão bicarbonato de amônio 100 mM, ureia 3M, pH 7,8 e permaneceram em estufa a 37°C por uma hora. Em seguida, foi adicionado 10 μL de DTT (10 mM) e as amostras foram armazenadas em estufa a 37°C pelo período de uma hora. A solução de IAA (25 mM) foi adicionada e a solução mantida no escuro à

temperatura ambiente por mais uma hora. A amostra foi diluída em tampão bicarbonato de amônio 100 mM na proporção 1:4. Por fim, foi adicionada a enzima tripsina (Promega) (20 ng/L) e as amostras permaneceram em estufa a 37°C overnight. Após a paralisação da reação com ácido fórmico 1% (v/v) a amostra foi submetida à coluna Sep-Pack C18 (Waters) para concentração da amostra.

4.2 Experimentos de LCMS-IT-TOF-MS

As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo. Durante todo o experimento o software LCMS Solution versão 3.5 (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200° C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5 V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1,5 L/h. O argônio foi utilizado como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa. Os íons produzidos através dos experimentos MS/MS foram aprisionados e acumulados durante 50 ms no “ion trap”, utilizando-se energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz, para os íons moleculares de carga +2 ($[M+2H]^+$), +3 ($[M+3H]^+$), e assim sucessivamente. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, com uma resolução de aproximadamente 15000. Os experimentos de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, os espectros de fragmentação peptídica foram obtidos em condições de decomposição induzida por colisão (CID). Para espectros MS2 foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS1.

4.3 Bioinformática proteômica

O servidor MASCOT versão 2.3 foi utilizado como ferramenta de bioinformática para identificação das proteínas, disponível em (www.matrixscience.com). A fim de precisar a identificação, foram estabelecidos os seguintes parâmetros experimentais: tripsina como agente de clivagem; taxonomia Rodentia; Carbamidometilação do resíduo de cisteína como modificação fixa; Oxidação do resíduo de metionina como modificação variável; número de clivagens perdidas pela enzima admitido foi de 1; Os dados de massa molecular do tipo: Monoisotópica; erro de tolerância de peptídeos $\pm 0,5$ Da e erro de tolerância de MS/MS $\pm 0,8$ Da; Protonação: +1, +2 e +3 para o estado da carga dos peptídeos; tipo de instrumento: ESI-TRAP e o Decoy foi selecionado. A

partir da análise realizada no Gene Ontology Consortium disponível em: <http://www.geneontology.org/>, foi setado entre os parâmetros o modo Default. Fornecendo a ontologia do produto dos genes, os domínios celular e molecular, os quais descrevem a função, localização, bem como conjuntos de eventos moleculares pertinente para o funcionamento integrado das proteínas às células, tecidos, órgãos e organismos.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Grupos amostrais e Classes biológicas

Os grupos amostrais foram categorizados e denominados por:

- I. Endoproteoma de mastócitos NÃO ativados: Este grupo corresponde às proteínas presentes na fração pertencente ao domínio intracelular dos mastócitos que não foram sensibilizados pelo mastoparano Protopolybia MP-III. O número absoluto de proteínas encontrado foi de 165.
- II. Endoproteoma de mastócitos Ativados: Este grupo corresponde às proteínas presentes na fração pertencente ao domínio intracelular dos mastócitos que foram sensibilizados pelo mastoparano Protopolybia MP-III. O número absoluto de proteínas encontrado foi de 154.
- III. Secretoma de mastócitos NÃO ativados: Este grupo corresponde às proteínas presentes na fração secretada pelos mastócitos que não foram sensibilizados pelo mastoparano Protopolybia MP-III. O número absoluto de proteínas encontrado foi de 136.
- IV. Secretoma de mastócitos Ativados: Este grupo corresponde às proteínas presentes na fração secretada pelos mastócitos que foram sensibilizados pelo mastoparano Protopolybia MP-III. O número absoluto de proteínas encontrado foi de 167.

As proteínas identificadas de cada grupo amostral foram agrupadas em 11 distintos grupos funcionais, para permitir a interpretação dos processos moleculares e bioquímicos desenvolvidos pelos mastócitos durante a experimentação. Os grupos funcionais identificados na consulta à base de “Gene Ontology Consortium” foram:

1. Adesão Celular: compreende as proteínas fundamentais na manutenção da integridade dos tecidos, juntamente com a matriz de colágeno intersticial ou à membrana basal (ALBERTS et al., 2004. p. 1133).

2. Apoptose: inclui as proteínas associadas ao processo de morte celular, essencial na manutenção da homeostase tecidual. O reconhecimento do processo apoptótico como mecanismo celular fundamental avalia as alterações morfológicas e bioquímicas das vias intracelulares e a complexa biologia molecular de genes e elementos efetores (BAKER; REDDY, 1996, p. 1-9).

3. Autoproteção: é a ação das proteínas ligadas à defesa inicial e rápida contra infecção por microrganismos, contra o estresse oxidativo, na prevenção de mudanças estruturais e/ou conformacionais de proteínas importantes, causadas por mudanças de parâmetros físicoquímicos do citoplasma celular, tais como pH, força iônica, ou de fatores externos como mudanças elevadas de temperatura, ou ainda contra a ação de proteases endógenas. Estão incluídos neste grupo proteínas tais como: proteínas de choque térmico, inibidores de proteases, superóxido dismutases, glutathione S-transferase, entre outras (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2013, p.3-51).

4. Endocitose: relacionada ao processo de entrada seletiva do material extracelular para a célula. Ocorre nas regiões da membrana plasmática invaginada e formam vesículas endocíticas, que ao fundirem-se, formam os lisossomos primários, constituindo posteriormente os lisossomos secundários, no qual o conteúdo da vesícula é digerido (ALBERTS et al., 2004. p. 1150).

5. Exocitose: agrega as vesículas intracelulares fundidas com a membrana plasmática, dessa forma, são adicionados componentes à membrana plasmática e também representa uma via pela qual moléculas impermeantes podem ser liberadas para o fluido extracelular, como ocorre em parte dos componentes secretados pelos mastócitos (SANTOS et al., 2012).

6. Housekeeping: são as proteínas essenciais para a manutenção dos processos básicos como geração de energia, replicação e manutenção do material genético (BASTOLLA, 2007, p. 19-20).

7. Metabolismo Energético: este grupo é constituído por proteínas que exercem importante função nas células, através de reações químicas para suprir as demandas celulares de energia; neste processo atuam principalmente as enzimas da cadeia de transporte de elétrons (ELLIOTT, 2011, p. 109-177).

8. Proteassoma: caracteriza-se por ser uma via proteolítica de fundamental importância para a viabilidade celular, o sistema proteolítico dependente de ATP e ubiquitina é formado por uma protease de peso molecular entre 1000 a 1500 kDa, composta por subunidades de 34-110 kDa e com um coeficiente de sedimentação de 26S, sua atuação está envolvida na degradação e alteração da função de um substrato, ou então, alterando a mediação entre proteína- proteína, através de uma cascata multi-enzimática nas quais enzimas se ligam à ubiquitina por meio de ligações tiol-éster. Este processo é muito importante para a degradação de proteínas que não estão sendo mais

utilizadas pelas células, e na reciclagem dos amino ácidos das proteínas–alvos (CIECHANOVER, 1998, v. 17, p. 7151–7160).

9. Função Mastocitária: é desenvolvida e adaptada às infecções e alergias, possuindo uma incrível capacidade em distinguir os diferentes microrganismos e moléculas. As principais proteínas associadas ao mecanismo alergênico são oriundas dos mastócitos que liberam mediadores químicos sinalizando a inflamação (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2013, p.3-51).

10. Reorganização do Citoesqueleto: demonstra que alterações na membrana plasmática podem envolver alterações morfológicas bem como mudanças na fluidez da membrana, isto devido a modificações na síntese e degradação de lipídeos em consequência da ativação de fosfolipases e esfingomielases, mas também decorrentes da desforilização de proteínas que estabilizam a ligação das moléculas de actina (FILHO, 2004, p.367).

11. Transdução de Sinal: relaciona-se ao sistema de comunicação e coordenação das atividades e funções celulares como o reparo de tecidos, sinalização de respostas imunes e a permanência da homeostasia nos organismo (MOURA; VIDAL, 2011, p.31-36).

Demais proteínas classificadas por Imunoglobulinas foram selecionadas e categorizadas à parte, estando localizadas no APÊNDICE A. Esses complexos protéicos estão associados a diversos mecanismos de proteção e reconhecimento presentes no sistema imunológico atuando de modo integrado ao sistema biológico.

5.2 Identificações das proteínas

Após a obtenção dos espectros de massas de cada grupo amostral, as proteínas foram identificadas, e tais identificações foram curadas pelo uso ferramentas de bioinformática descritas na metodologia. As tabelas a seguir contêm informações relacionadas à abordagem proteômica *shotgun*, na qual os seguintes parâmetros devem ser observados para cada proteína: Código de acesso, identificação, porcentagem de cobertura, MS/MS *Peptide Sequence (Ion Score)*, Mascot score e Organismo.

- Endoproteoma de mastócitos NÃO ativados

TABELA 1- Identificações das proteínas obtidas do Endoproteoma de mastócitos NÃO ativados.

Código de acesso	Identificação	% de Cobertura	MS/MS Peptide Sequence (Ion Score)	MASCOT score	Organismo
ADESÃO CELULAR					
AAO74895	ADAMTS20 B long isoform	1	MCQGLHRR (18) GPWKSCSASC GK (3)	22	<i>Mus musculus</i>
P24090	Alpha-2-HS-glycoprotein	8	VPFPVSTLVEFVIAATDCTGQEVTDPAK (32)	32	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA37592	Focal adhesion kinase	1	THLGTGMER (22) DIAAR (10)	32	<i>Mus musculus</i>
NP_037106	Laminin, beta 1	4	LQGLDMGVLQVFAFGVLALWGTR (11) YVVLPR (5) PVCFEKGMNYTR (13)	24	<i>Rattus norvegicus</i>
AAL23696	Liprin alpha 3	1	MALER (14) DEAGVPR (14)	28	<i>Rattus norvegicus</i>
AAG12206	Receptor tyrosine kinase EphA1	1	LNVER (21) DLAAR (12)	33	<i>Mus musculus</i>
NP_001013960	Von Willebrand factor A 1 precursor	3	MLFWTVLSMALSLR (17)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_061353	WNT1- pathway protein 1 precursor	1	TYRPK (20)	20	<i>Mus musculus</i>
APOPTOSE					
NP_001020564	Bcl-2-associated transcription isoform 3	25	YSSR (11) HSRSPR (5)	89	<i>Mus musculus</i>
AAH65101	Huntingtin interacting protein 1 related	4	EAELLAAQSLVR (7) TVNERAAYVVASTK (11)	43	<i>Mus musculus</i>
NP_001008369	NAD-dependent deacetylase sirtuin-2	2	SPPPAK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>

NP_032680	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A	1	QEGEAK (13)	13	<i>Mus musculus</i>
			LIESMEK (5)		
AAL41031	Ring finger box-coiled coil transcription factor	4	GMKTIVPR (5) QVLPDDPER (11)	21	<i>Mus musculus</i>
AAC52710	TRAFamn	1	ADCKEK (20)	20	<i>Mus musculus</i>
AUTOPROTEÇÃO					
EDM06060	Heat shock protein, alpha-crystallin-related, B9	5	IDGQNLMTVGK (16)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
			SAILYFPK (12)		
P17475	Alpha-1-antiproteinase	8	TLLSSLGITR (50) VFNNADLSGITEDAPLK (22)	50	<i>Rattus norvegicus</i>
			ADSHFR (8)		
NP_001033064	Alpha-1-inhibitor 3 precursor	1	EKDVR (24) LGHVSR (18)	50	<i>Rattus norvegicus</i>
			AGLQAFFQVR (18)		
NP_036664	Ceruloplasmin precursor	1	MYYSGVDLTK (27)	45	<i>Rattus norvegicus</i>
AAG45053	Cytochrome b5 reductase 4	1	ETVSWK (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
			AGLQAFFQVR (18)		
AAF34175	GPI-anchored ceruloplasmin	1	MYYSGVDLTK (27)	45	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001102305	Heat shock protein, alpha-crystallin-related, B9	5	IDGQNLMTVGK (16)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
AAP21829	Peroxiredoxin 6	14	SAGTGAATAR (18)	18	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_036789	Serine protease inhibitor A3K	2	TSMVLVNYLLFK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
ENDOCITOSE					
			AAFDVNNK (9)		
BAC98292	Breakpoint cluster region protein	3	DVSVMSEMDVNAIAGTLK (8)	15	<i>Mus musculus</i>
			GADGVMR (13)		
AAB97078	Clathrin assembly protein short form	1	IKDSTAASR (14)	27	<i>Rattus norvegicus</i>

AAH46250	Dedicator of cytokinesis protein 9	1	FAFELK (9) LEGSGSGLDSYLP ELAK (17)	26	<i>Mus musculus</i>
NP_620612	Exocyst complex component 8	3	IEGATLLYIHK LCHVFFTSLETAR (8)	8	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_666306	Phosphatidylinositol-binding clathrin	3	DSTAASR (14)	27	<i>Mus musculus</i>
AAH11470	Picalm protein	3	GADGVMR (13)	27	<i>Mus musculus</i>
NP_891846	Pleckstrin homology domain member 6 isoform 1	1	NPNAPVTK (16) AGWLYK (10)	26	<i>Mus musculus</i>
NP_663374	Secretagogin	6	LETPLDNSVEFMQIWRK (16)	16	<i>Mus musculus</i>
AAP92615	Signal recognition particle receptor subunit beta	19	TAGWNIPMGLLFSR (14)	51	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_113781	Synaptic vesicle glycoprotein 2C	2	MEDSYKDRTSLMK (14) TSLMKGAK (19)	42	<i>Rattus norvegicus</i>
AAF20283	Thymic dendritic cell-derived factor 1	2	MAAPKGK (11)	11	<i>Mus musculus</i>
NP_808544	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	4	YQELQVLFEAYQIK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
EXOCITOSE					
P24942	Excitatory amino acid transporter 1	1	ASGKMGMR (15)	15	<i>Rattus norvegicus</i>
81688	Exocyst complex component 8	3	IEGATLLYIHKLCHVFFTSLETAR (8)	8	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_062662	Rap guanine nucleotide exchange factor 4	2	EVISAVADK (8) MNSGGEK (5) MIANTAR (6)	19	<i>Mus musculus</i>
NP_113781	Synaptic vesicle glycoprotein 2c	2	MEDSYKDR (9) MEDSYKDR (3) TSLMK (14) TSLMKGAK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
FUNÇÃO MASTOCITÁRIA					
AAA63757	Cannabinoid receptor 2	4	YLQGLGPEGEEAPR (14)	14	<i>Mus musculus</i>

Q9D9G2	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4	5	HWLVSNITGADMK (25)	25	<i>Mus musculus</i>
			TGEIK (8)		
AAC72823	Rho/rac-interacting citron kinase	1	LVDFGSAAK (9)	19	<i>Mus musculus</i>
			LLMIAGEER (10)		
AAC52710	TNF receptor-associated factor 3	1	ADCKEK (20)	20	<i>Mus musculus</i>
BAA12705	TRAF6	1	DDTLLVR (21)	21	<i>Mus musculus</i>
HOUSEKEEPING					
NP_079577	Ribosomal protein precursor	15	LSLAAAISHGR (29)	37	<i>Mus musculus</i>
			LIDYGKLGDTNERAMR (8)		
AAH23285	6430537H07Rik protein	2	SHGLIK (13)	13	<i>Mus musculus</i>
P17764	Acetyl-CoA acetyltransferase	1	LSISR (22)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_113691	Achaete-scute homolog 2	8	LQKASDACPR (6)	12	<i>Rattus norvegicus</i>
			ESCSSALPEAR (6)		
AAL56246	Aldehyde dehydrogenase ALDH3B1	1	INDLR (19)	19	<i>Mus musculus</i>
NP_076106	Aldehyde oxidase 3	1	MAEESQNTVLTFR (10)	21	<i>Mus musculus</i>
			AIYSSK (11)		
NP_001074494	AMY-1 protein expressed 1 homolog	1	GLPAGQAEVEIER (14)	14	<i>Mus musculus</i>
NP_766510	Ankyrin protein kinase containing protein 1	1	WMEQSTQKQYIER (26)	26	<i>Mus musculus</i>
AAN77118	Arginine/serine-rich 14 splicing factor	2	YGDSEAVGEALHLK (10)	19	<i>Mus musculus</i>
			AQDLLRTGSR (9)		
NP_001182488	Calmodulin binding transcription isoform 1	1	GLPPQSGASGGNK (16)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH42726	Ccdc138 protein	5	TCSVLLR (7)	22	<i>Mus musculus</i>
			LSKIKSNKK (15)		
BAE21972	Chromosome alignment-maintaining	1	EMGSTQAK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
BAC15600	Clk4 associating SR-related protein	23	YRSR (11)	83	<i>Mus musculus</i>
			TEPAAGK (3)		

EDL33631	Cyclin-dependent kinase-like 3, isoform CRA_a	2	TGQNDQISSGNKRK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
AAA74049	Dishevelled-1 protein	1	SDMSAIVR (25)	25	<i>Mus musculus</i>
CAA32910	DNA methyltransferase 1	1	HQVSEPK (10) EPEAAIKLPK (8)	18	<i>Mus musculus</i>
NP_071582	DNA repair protein RAD50	1	LRLAPDKLK (17) GDTALDMR (15)	32	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH46250	Dock9 protein	1	FAFELK (9)	17	<i>Mus musculus</i>
BAC29476	Dual specificity protein phosphatase	2	LEGSGSGLDSYLPK (17) NNVTQGDK (10)	17	<i>Mus musculus</i>
NP_445800	Fetuin B precursor	5	LRALK (7) VQKDGMYMLTLNR (4)	38	<i>Rattus norvegicus</i>
I56329	Gene D3 protein	2	LVVLPFGK (12) IVLLR (6) VTKAGK (19)	25	<i>Mus sp.</i>
AAA20540	Glial fibrillary acidic protein	1	LSLSR (22)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
AAF34175	GPI-anchored ceruloplasmin	1	AGLQAFFQVR (18)	45	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_766365	Guanylate binding protein family, member 9	1	MYYSGVDLTK (27) EGIKVTGNR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
NP_445770	Hemopexin precursor	5	ELISER (8) GGNNLVSGYPK (5) LYVTSGR (9)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH04053	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	DAILTEAIK (23)	23	<i>Mus musculus</i>
CAA29291	Histone H2A type 1	14	VTIAQGGVLPNIQAVLLPK (45)	51	<i>Mus musculus</i>
0506206A	Histone H2B	13	QVHPDTGISSK (9)	26	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA34274	Histone H3.2	14	STITSR (17) STELLIR (37)	63	<i>Mus musculus</i>

NP_038576	Histone H3.2b	9	EIAQDFK (17) DIQLAR (9) EIAQDFK (17)	26	<i>Mus musculus</i>
CAA28350	Histone H4	14	DIQLAR (9) VFLENVIR (40)	40	<i>Mus musculus</i>
NP_604453	Homologous-pairing protein 2 homolog	2	ECAR (24)	24	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH04053	Hp1bp3 protein	2	DAILTEAIK (23)	21	<i>Mus musculus</i>
AAA41360	IF1 protein	8	TREQLAALK (11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
ABV58177	Interphotoreceptor retinoid binding protein	1	PEAAR (17) VEAAR (12) PEAAR (17)	29	<i>Mus musculus</i>
NP_579935	keratin, type II cytoskeletal 75	1	SSGNSGGLGR (19)	19	<i>Mus musculus</i>
NP_835170	Large subunit GTPase 1 homolog	2	TESESSSLDANEIPHR (12)	9	<i>Mus musculus</i>
NP_084460	LisH domain protein ARMC9 isoform 1	2	TYLETK (10) EEARAMGMEDILR (15)	24	<i>Mus musculus</i>
NP_077378	Major fibrous sheath protein precursor	3	VLLK (15) VSEHILK (5)	24	<i>Mus musculus</i>
EDL96529	Matrilin 4	2	ESLTMWNTQK(4) MAVTLR (6)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
AAC53127	MEK kinase 4b	1	FFILPSTMK (10) DLEIAAEFVLSASAR (3) ELLDALK (10)	13	<i>Mus musculus</i>
AAF67845	Molybden synthesis 1 protein A splice type I	4	MVSYK (6)	11	<i>Mus musculus</i>
NP_001164324	Myeloid nuclear differentiation antigen like	2	IVLLK (9)	28	<i>Mus musculus</i>
EDM18574	NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial	2	LACGSLR (23)	23	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_997473	N-myristoyltransferase 2	3	LEGFISAIPANIRIYDSVK	16	<i>Rattus norvegicus</i>

AAA42263	Nonmuscle tropomyosin	27	EQAEAEVASLNR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
AAB61575	Nuclear receptor coactivator protein 2	1	QMQQVQQR (8)	16	<i>Mus musculus</i>
CAB95737	Nuclear receptor-interacting protein 2	2	DEGDSR (15)	15	<i>Mus musculus</i>
AAH82811	GYF domain-containing protein 2	1	QEEALR (11)	11	<i>Mus musculus</i>
Q9D9G2	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4	5	HWLVSNITGADMK (25)	25	<i>Mus musculus</i>
NP_891846	Pleckstrin domain family A member 6 isoform 1	1	NPNAPVTK (10)	26	<i>Mus musculus</i>
NP_080616	Processing of precursor 1 isoform 2	1	AGWLYK (16) PPAK (19)	28	<i>Mus musculus</i>
CAA11833	Protein kinase	1	ESGPGQK (11)	11	<i>Mus musculus</i>
AAK54280	Protocadherin-betaE	8	DLGLGAGELAR (16)	16	<i>Mus musculus</i>
AAH04052	Psmc5 protein	8	LEGGSGGDSEVQR (17)	34	<i>Mus musculus</i>
AAB60517	RNA1 homolog	1	VHVTQEDFEMAVAK (17) LAETLAK (24)	24	<i>Mus musculus</i>
EDL15541	Signal sequence receptor, gamma, isoform CRA_b	4	VFSSAMAPK (21)	21	<i>Mus musculus</i>
NP_001102531	Similar to Cell division protein kinase 8	3	EIALLR (10)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_058919	Sodium-dependent phosphate transporter 2	1	ASDESLR (23)	23	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_775460	Solute carrier anion transporter family	1	IDTYLR (11)	21	<i>Rattus norvegicus</i>
AAC61697	Sphingosine kinase	1	ALLGTPK (16)	16	<i>Mus musculus</i>
AAG01032	Stat3-interacting protein	1	DLFLASCSQDCLIR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
AAG34791	Striated muscle serine/threonine protein kinase	1	GTRGEDAGTR (4)	35	<i>Mus musculus</i>
NP_113871	Structural maintenance of chromosomes 1A	1	VGAGR (6) QCEAR (17) LSSTLER (8) EMVK (17)	33	<i>Rattus norvegicus</i>
AAN77118	SURP and G-patch domain-containing protein 2	2	YSQSDLEQTK (16) YGDSEAVGEALHLK (9) AQDLLR (9)	19	<i>Mus musculus</i>

AAA39920	Testis-specific phosphoglycerate kinase	1	TGSR (2) AAIPSIK (8)	16	<i>Mus musculus</i>
AAA40916	Thyroid hormone receptor	1	LAKRK (7)	7	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH16211	Timeless interacting protein	4	GLPALR (7)	14	<i>Mus musculus</i>
BAA86392	Transcription factor CA150b	1	HVFDK (14) LFNEHIEALTK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
S30049	Transcription factor DRTF1 chain 1	1	HFSMK (8)	8	<i>Mus musculus</i>
BAA07458	Transferrin	6	GTDFQLNQLQGK (1) DGGGDVAFVK (21) GYAVAVVK (24) ASDSSINWNNLK (4)	24	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_808394	Transglutaminase 6	2	GDLTEDK (8) ILLAAMCLVSK (8)	16	<i>Mus musculus</i>
AAC13550	Transient receptor potential protein 5	1	SVSFNVGCK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
NP_001002272	Trophinin isoform 1	1	DPPIASR (6)	11	<i>Mus musculus</i>
EDL37831	TXK tyrosine kinase, isoform CRA_b	2	MGKTQSNR (10) DLAAR (10)	19	<i>Mus musculus</i>
AAA85185	Very-long chain acyl-CoA dehydrogenase	8	MAILQYVTESMAYMLSANMDQGFK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
AAK72960	Voltage channel pore subunit CaV1.3alpha1	1	HLDVVTLLR (24)	24	<i>Rattus norvegicus</i>
AAI45651	Vomeroneasal 1 receptor, I10	9	GLSISTTCLLSMVQAVTISPR (7)	15	<i>Mus musculus</i>
AAG42096	Vomeroneasal receptor V1RC6	5	HQRQYK (12)	24	<i>Mus musculus</i>
EDL03537	Zinc finger CCCH type containing 12D	2	VNGK (8)	20	<i>Mus musculus</i>
AAI38265	Zinc finger CCCH type containing 13	26	LSEHRH (12) SPMREK (5) LQERDR (6)	87	<i>Mus musculus</i>
NP_001092798	Zinc finger protein 831	2	GTPDSIPR (16)	26	<i>Mus musculus</i>

METABOLISMO ENERGÉTICO					
P17764	Acetyl-CoA acetyltransferase	1	LSISR (22)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_653349	Acyl-coenzyme A mitochondrial	4	FDPQTVLK (10) VLSSYPINTLLGAPLIYR (10)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
CAK50800	Pyruvate dehydrogenase E1 alpha 2	3	GLPVR (7) SILAELTGR (14)	14	<i>Mesocricetus auratus</i>
AAA85185	Very-long chain acyl-CoA dehydrogenase	8	MAILQYVTESMAYMLSANMDQGFK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
PROTEASSOMA					
NP_001093979	Proteasome 26S subunit, ATPase, 6	6	LEGGSGGDSEVQR (17) VHVTQEDFEMAVAK (17)	34	<i>Rattus norvegicus</i>
BAA22935	Proteasome p45/SUG	7	LEGGSGGDSEVQR (17)	34	<i>Rattus norvegicus</i>
AAG01032	Stat3-interacting protein	1	DLFLASCSQDCLIR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
REORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO					
BAE39957	Actin, cytoplasmic 1	12	AVFPSIVGRPR (8)	55	<i>Mus musculus</i>
			GILTLK (5)		
			GYSFTTTAER (18)		
			EITALAPSTMK (14)		
			IIAPPER (10)		
NP_446326	Adenylyl cyclase-associated protein 2	3	IYKNPSLR (10) AQGQIR (7)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH02193	Bcr protein	11	AAFDVNNK (10) DVSVMMSSEMDVNIAIGTLK (5)	15	<i>Mus musculus</i>
CAA24528	Beta actin	12	AVFPSIVGRPR (8) GILTLK (5)	55	<i>Rattus norvegicus</i>

			GYSFTTTAER (18)		
			EITALAPSTMK (14)		
			IIAPPER (10)		
AAB18988	Fer	1	FMALR (12)	32	<i>Mus musculus</i>
			EALAK (8)		
			DLAAR (12)		
AAH65101	Huntingtin interacting	4	EAELLAAQSLVR (7)	25	<i>Mus musculus</i>
			TVNERAAYVASTK (11)		
			TDNQLDK (25)		
NP_579935	Keratin cytoskeletal	1	SSGNSGGLGR (19)	19	<i>Mus musculus</i>
NP_001008369	NAD-dependent	2	SPPPAK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA65655	Profilin	5	TLVLLMGK (30)	30	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA40021	Protein tyrosine phosphatase	1	GYSGKEK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
BAB61894	Stathmin	81	LERLR (76)	76	<i>Mus musculus</i>
			SKDFQLFGSPLGK (24)		
			DSAFGLLR (40)		
NP_001013128	Transferrin precursor	6	LYLGHSYVTAIR (19)	131	<i>Rattus norvegicus</i>
			DLFWK (8)		
			DLLFR (18)		
AAB18988	Tyrosine	1	FMALR (12)	32	<i>Mus musculus</i>
			EALAK (8)		
			DLAAR (12)		
CAA35803	Vimentin	6	VELQELNDR (16)	26	<i>Mus musculus</i>
			FADLSEAANR (26)		
			EYQDLLNVK (10)		
TRANSDUÇÃO DE SINAL					
NP_446326	Adenylyl cyclase-associated protein 2	3	IYKNPSLR (7)	17	<i>Rattus norvegicus</i>

CAH19223	Ankyrin G197	1	AGHLEK (2)	28	<i>Rattus norvegicus</i>
			ALDYIK(7)		
			AGHLEK (3)		
			ALDYIK (6)		
			VIIK (15)		
AAH02193	Bcr protein	11	AAFDVNNK (5)	15	<i>Mus musculus</i>
			DVSVMSEMDVNIAIAGTLK (10)		
AAH58783	Cacna1d protein	1	HLDVVTTLLR (24)	24	<i>Mus musculus</i>
BAA00648	Contrapsin-like protease inhibitor	2	TSMVLVNYLLFK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA74049	Dishevelled-1 protein	1	SDMSAIVR (25)	25	<i>Mus musculus</i>
AAH46250	Dock9 protein	1	FAFELK (9)	26	<i>Mus musculus</i>
			LEGSGSGLDSYLPOLAK (17)		
AAG12206	Ephrin type-A receptor 1	1	LNVER (21)	33	<i>Mus musculus</i>
			DLAAR (12)		
AAD27619	Extra large alpha polypeptide	5	GLLRGR (29)	29	<i>Mus musculus</i>
AAH82811	Gigyf2 protein	1	QEEALR (11)	8	<i>Mus musculus</i>
AAC61697	Kinase	1	ALLGTPK (16)	16	<i>Mus musculus</i>
			MLRK (7)		
AAC53127	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	1	DLEIAAEFVLASAR (4)	13	<i>Mus musculus</i>
			ELLDALK (2)		
NP_036964	Nicotinic acid receptor	2	SLGETDNR (17)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA40021	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase R	1	GYSGKEK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001012078	Semaphorin 4A	2	DHFLMDEHVVGAPLLVK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_036789	Serine protease inhibitor A3K	2	TSMVLVNYLLFK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
AAC13550	Transient receptor potential protein 5	1	SVSFNVGCK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
EDL15541	Translocon-associated protein subunit gamma	4	VFSSAMAPK (21)	21	<i>Mus musculus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

- **Endoproteoma de mastócitos ATIVADOS**

TABELA 2 - Identificações das proteínas obtidas do Endoproteoma de mastócitos ATIVADOS.

Código de acesso	Identificação	% de Cobertura	MS/MS Peptide Sequence (Ion Score)	MASCOT score	Organismo
ADESÃO CELULAR					
AAO74895	ADAMTS20 B long isoform	1	MCQGLHRR (18) GPWKSCSASC GK (3)	22	<i>Mus musculus</i>
NP_001013960	Von Willebrand factor A domain	3	MLFWTVLSMALSLR (17)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
BAC26211	Allograft inflammatory factor 1-like	6	DFVNK (5)	15	<i>Mus musculus</i>
EGW07939	Collagen alpha-1(XV) chain	1	LSLWLLAPCSR(11)	11	<i>Cricetulus griseus</i>
AAR98612	Connexin30.2	12	EAGGAQPATPCTR (15)	15	<i>Mus musculus</i>
NP_446171	Embigin precursor	2	NDPDDGK(11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
AAG12206	Ephrin type-A receptor 1	1	LNVER (20)	36	<i>Mus musculus</i>
EHB08100	Protocadherin beta-7	2	VPENTPVGSLVIAVSAR (15)	15	<i>Mus musculus</i>
APOPTOSE					
NP_035935	Death-inducer obliterator 1 isoform 1	1	ALGSAALVGSMR (12) FEAGPK (9)	21	<i>Mus musculus</i>
AAA16492	Induced by effectors of apoptosis	3	TLLKVVGQLTR(9)	9	<i>Rattus norvegicus</i>
BAB26601	Protein FAM162A	6	EAAAMK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
AUTOPROTEÇÃO					
CAA33735	70kDa heat shock protein HST70	3	DIGPNRAVR (6) TITNDK (4) ITITNDK (4)	12	<i>Rattus norvegicus</i>

P17475	Alpha-1-antiproteinase	2	STTVK (4)	29	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_071964	Alpha-1-antiproteinase precursor	3	FLLNR (10)	44	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA40788	Alpha-1-antitrypsin precursor, partial	11	VPMMNR (6) AVLTLDER (34) FLLNR (10) TLLSSLGITR (48) VIDPTR (25)	150	<i>Rattus norvegicus</i>
BAA24420	Alpha-1-antitrypsin-like protein	3	VPMMNR (6) AVLTIDER (34)	38	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>
BAA00648	Contrapsin-like protease inhibitor	12	DTLPHEQDGK (25) IAELFSDLDER (6) TSMVLVNYLLFK(4) IISLR(11) ITGTK(5)	69	<i>Rattus norvegicus</i>
EHB04305	Heat shock 70 kDa protein 12B	1	FVEGR (12) HPPDKLLVR (11)	23	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAH04714	Heat shock protein 2	3	DIGPNRAVR (6) ITITNDKGRLSK(6)	12	<i>Mus musculus</i>
gi 204621	Hemopexin	9	GEFVWR (20) FNPVTGEVPPR (14) DYFISCPGR (24) LYVTSGR (5) VDGALCLEK (8)	71	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA40525	Lactotransferrin precursor	2	SCHTGIGR (23) DLLFK (24) DLLFK (23) ESAIGFVR (18)	88	<i>Mus musculus</i>

BAB29330	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4	1	SPKSK (10)	10	<i>Mus musculus</i>
CAA34349	Proteinase inhibitor-like protein	14	VDLMK (12) STTVK (4) VPMNR (6) FLLNR (10) AVLTLDER (34)	66	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA34407	Serine protease inhibitor A3K	3	IISLR (11) NLHVSQVVK (18)	29	<i>Rattus norvegicus</i>
EH02652	Serine protease inhibitor Kazal-type 4	14	DIQIK (22)	22	<i>Mus musculus</i>
AAH78824	Serpin peptidase inhibitor, clade A	10	IVDLMK (23) STTVK (4) VPMNR (6) FLLNR (10) TLLSLGTR (48) AVLTLDER (34) VIDPTR (25)	150	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA83430	T-complex protein 1 subunit epsilon	2	MIIEAK (22)	22	<i>Mus musculus</i>
ENDOCITOSE					
BAE24416	Inactive phospholipase C-like protein 1	1	NMIVK (8)	8	<i>Mus musculus</i>
AAC15875	mPRL-3	10	MARMNR (7) PAPVEVSYR (8)	15	<i>Mus musculus</i>
AAH83893	Sel-1 suppressor of lin-12-like 2	1	NSEAER (11) HQHKLK (6)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
EDM02215	Solute carrier family 39	1	MVTMER (22)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA42273	Transferrin receptor protein 1	1	HPIDGK (11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
EXOCITOSE					
BAB29270	ATP-binding sub-family B mitochondrial	1	MAMDMR (24)	24	<i>Mus musculus</i>
NP_665822	Cytoplasmic phosphatidylinositol transfer	4	TGRGQLR (5)	10	<i>Mus musculus</i>
CAA45276	Glutamate/aspartate transporter	1	MGRMER (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>

NP_446068	Nuclear pore complex protein Nup88	2	ICSFR (23) DLLFR (16)	39	<i>Rattus norvegicus</i>
FUNÇÃO MASTOCITÁRIA					
P10688	Phosphatidylinositol 4,5 phosphodiesterase	1	QWVEGLR (22) AERER (9)	31	<i>Rattus norvegicus</i>
AAL57361	Ankyrin repeat and SOCS box protein 14	2	LDMVK (16) LKAVLEK (12)	28	<i>Mus musculus</i>
AAP32037	Carboxypeptidase A	2	DNLVAENPGLVSK (10)	28	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001013063	C-C motif chemokine	10	AMGGK (4) VPVQR (7) VRAMGGK (4) VPVQR (10)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
EH08278	C-C motif chemokine 24	10	AMGGK (4) VPVQR (7) VRAMGGK (4) VPVQR (10)	17	<i>Heterocephalus glaber</i>
NP_032029	Fibroblast growth factor 15 precursor	6	MFSLPLESDSMDPFR (9)	9	<i>Mus musculus</i>
CAA39083	Fibroblast growth factor receptor 2	1	MVSWGR (19)	19	<i>Mus musculus</i>
EHA99132	Growth/differentiation factor 11	2	GEAAAVR (29)	29	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAL67332	Inhibin alpha-subunit precursor	1	LVLAK (9)	9	<i>Phodopus sungorus</i>
AA34554	Interferon alpha 3	9	TEIMK (6) SFSSSANLYGRLR (12)	12	<i>Marmota himalayana</i>
AAB30165	Interferon gamma receptor beta subunit	1	DGSPK (15)	15	<i>Mus musculus</i>
NP_001159369	Interferon alpha responsive protein	9	TEIMK (6) SFSSSANLYGR (12)	12	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001014188	Interleukin 33 precursor	2	SGLTIR (13)	13	<i>Rattus norvegicus</i>
AA063014	Interleukin-1 receptor kinase 1 splice form 3	1	APAQAAQQLR (13)	13	<i>Mus musculus</i>
EGW06966	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	1	DTGTYR (13)	13	<i>Cricetulus griseus</i>
NP_001099190	NF-kappa-B inhibitor alpha	9	TEIMK (6) SFSSSANLYGR (12)	12	<i>Rattus norvegicus</i>

EDL82189	Phospholipase A2	4	NGIHK (10)	10	<i>Rattus norvegicus</i>
P0C871	Phospholipase A2, group IVB	4	VPLRTLPSQLVR (22) MVRVLSLR (13)	34	<i>Rattus norvegicus</i>
Q9Z1B3	Phospholipase C-beta 4	1	QWVEGLR (22) AERERRVR (9)	28	<i>Mus musculus</i>
AAA16492	PRKC	3	TLLKVVGQLTR (9)	9	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_080953	Ras-related protein Rab-13	22	LQVWDTAGQER (17)	32	<i>Mus musculus</i>
AAG12206	Receptor tyrosine kinase EphA1	1	LNVER (20) DLAAR (16)	36	<i>Mus musculus</i>
EHB10236	Regulator of G-protein signaling 9	3	QVGLSSLPFMR (8) GCLASPVFAR (6)	14	<i>Heterocephalus glaber</i>
P53351	Serine/threonine-protein kinase PLK2	2	VGDFGLAAR (13) LEPLEHR (26)	26	<i>Mus musculus</i>
AAH78824	Serpin peptidase inhibitor, clade A	11	IVDLMK (23) STTVK (4) VPMNR (6) FLLNR (10) TLLSSLGITR (48) AVLTLDER (34) VIDPTR (25)	43	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH55767	Sox14 protein	1	GETGR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
AAH08598	TNF receptor-associated factor 7	1	MNLEAHLK (25)	25	<i>Mus musculus</i>
HOUSEKEEPING					
AAH23285	6430537H07Rik protein	2	SHGLIK (13)	13	<i>Mus musculus</i>
NP_598827	Aldo-keto reductase	2	GIVALAK (9)	9	<i>Mus musculus</i>
NP_001074586	Antigen KI-67	2	VNVK (12) EDSSAMQK (12)	24	<i>Mus musculus</i>
AAA40913	CELF	2	DLASLR (9)	9	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA83430	Chaperonin TCP-1 epsilon subunit	2	GGNK (12) MIIEAK (10)	22	<i>Mus musculus</i>
ABB89471	Chitotriosidase	2	LLTAAVPTGR (9)	9	<i>Rattus norvegicus</i>
AAB66830	Cleavage and polyadenylation specificity factor	1	AFGGK (7) DIKVYMPK (7)	14	<i>Mus musculus</i>
EHB10349	Codanin-1	1	QFALVLSLR (16)	16	<i>Heterocephalus glaber</i>

P18760	Cofilin-1	7	MASGVAVSDGVK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
CAA32910	DNA methyltransferase 1	1	HQVSEPK (8)	18	<i>Mus musculus</i>
EDL97668	EF-hand domain (C-terminal) containing 2	1	EPEAAIKLPK (10) NSGNAGGMFLK (10)	10	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001033589	Exocrine gland-secreting peptide 1	7	GIMEK (11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
AAC95468	Galanin receptor 2	2	TSQTMITLSR (9)	9	<i>Mus musculus</i>
EH06180	Gamma-butyrobetaine dioxygenase	1	DFVNLMSK (12)	12	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAI20674	Gipr protein	3	LLPGGTK (11)	11	<i>Mus musculus</i>
NP_081905	Glucose 1,6-bisphosphate synthase	1	NLLESGK (11)	11	<i>Mus musculus</i>
NP_783589	Histone cluster 1, H2aa	22	VYLAADVLEYLTAEVLELAGNAAR (31)	31	<i>Mus musculus</i>
CAA41099	Histone H2A	20	VYLAADVLEYLTAEILELAGNAAR (33)	33	<i>Mus musculus</i>
CAA34273	Histone H2A type 2-A	22	VYMAADVLEYLTAEILELAGNAAR (29)	29	<i>Mus musculus</i>
CAA56574	Histone H2a.2 protein	29	AGLQFPVGR (18) VYMAADVLEYLTAEILELAGNAAR (29)	29	<i>Mus pahari</i>
EHA99432	Histone H3.3	6	LPFQHLAR (14)	14	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAA41435	Inhibin alpha-subunit precursor	1	LVLAKE (9)	9	<i>Rattus norvegicus</i>
BAB24744	IQ domain-containing protein F1	2	GTLVR (7)	7	<i>Mus musculus</i>
Q80T74	Kelch-like protein 29	1	VCVSFLEK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
AAG12466	Kruppel-type zinc finger protein	5	MRLGK (4)	9	<i>Mus musculus</i>
CAA38896	Lyl-1	2	VEAAR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
EGV95252	Lysosomal thioesterase PPT2	2	LLMPAAPAPHR(22)	22	<i>Cricetulus griseus</i>
EH010433	Maltase-glucoamylase	1	VTYDPNLK (16)	16	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAC24209	Mesoderm/mesenchyme forkhead 1	1	DAVK (18)	18	<i>Mus musculus</i>
NP_082648	Metallo-beta-lactamase containing protein 2	4	QLTVMHMPGHSR (14)	14	<i>Mus musculus</i>
BAA11750	Msx-1 protein	3	MTSLPLGVK (11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
EH06585	Muellerian-inhibiting factor	1	GGAAR (27)	27	<i>Heterocephalus glaber</i>
EGV97503	NACHT repeat domain-containing protein 1	3	INAWNLETTK (22)	22	<i>Cricetulus griseus</i>
EH01902	Nuclear receptor coactivator 4	1	DLELAIGGVFR (22)	19	<i>Heterocephalus glaber</i>
CAB95737	Nuclear receptor-interacting protein 2	2	DEGDSR (15)	15	<i>Mus musculus</i>

NP_001012003	Origin recognition complex subunit 2	2	LASELTK (26)	26	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_113981	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G	50	ERDLTK (11)	189	<i>Rattus norvegicus</i>
BAB29330	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4	1	SPKSKS (10)	10	<i>Mus musculus</i>
XP_003462890	Protein LSM14 homolog B-like	1	GNGAAR (29)	29	<i>Cavia porcellus</i>
NP_001074776	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	1	QGVDLEQSR (13)	13	<i>Mus musculus</i>
NP_080359	Protein Zc3h13	23	SSKSPK (4)	214	<i>Mus musculus</i>
			GEPSR (1)		
EDL98004	rCG23279	10	EQAAVR (25)	25	<i>Rattus norvegicus</i>
EDL98820	rCG54749	34	MTAPEISMASK (13)	23	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH83893	Sel-1 suppressor of lin-12-like 2	1	ILVR (10)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
			NSEAER (11)		
			HQHKLK (6)		
EHB18806	SH3 domain RING finger protein 3	1	LLAGASTRKSRS(10)	10	<i>Heterocephalus glaber</i>
XP_003472619	Sialate O-acetyltransferase-like	1	GTVAAGR (29)	29	<i>Cavia porcellus</i>
AAL87040	Silencer-associated factor	2	SLQAK (10)	19	<i>Mus musculus</i>
			FPSDLK (9)		
EDL89210	Similar to Lmnb2 protein	5	NMLDAKEQEMAEVR (13)	32	<i>Rattus norvegicus</i>
EDM02215	Solute carrier family 39 (zinc transporter)	1	LALDMEICSYR (19)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
			MVTMER (22)		
EHB15260	Synapse-associated protein 1	4	MHFALVPK (15)	15	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAH83878	Threonyl-tRNA synthetase-like 2	1	LAEQGGPGAR (17)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
CAM24277	Titin	1	PAWER (11)	38	<i>Mus musculus</i>
			MVISEEK (13)		
			APEESK (17)		
EHB02663	Ubiquitin-associated protein 1, partial	1	VSSSAMQK (14)	14	<i>Rattus norvegicus</i>
AAG42087	Vomeroneasal receptor V1RB7	3	TSMFSAPMAIR (9)	9	<i>Mus musculus</i>
AAH87082	WW domain binding protein 11	1	TSAYGPPTR (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
CAB46282	XAP-5 protein	2	AMHLMK (9)	9	<i>Mus musculus</i>
AAH56221	Zfp583 protein	3	VLTMGR (6)	30	<i>Mus musculus</i>
			SVEMK (17)		

NP_001092798	Zinc finger protein 831	1	GTPDSIPR (16) SLEGMR (10)	26	<i>Mus musculus</i>
METABOLISMO ENERGÉTICO					
AAL87040	Phosphate 3-phosphatidyltransferase	2	SLQAK (9) FPSDLK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
BAB28903	Ceramide synthase 4	2	ILNYAHFR (22)	22	<i>Mus musculus</i>
AAH79351	Electron flavoprotein, beta polypeptide	3	VKVER (17) LAGVK (17)	34	<i>Mus musculus</i>
NP_062240	Lysosomal thioesterase	2	LLMPAAPAPHR(22)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
PROTEASSOMA					
BAC35910	BTB/POZ RhoA degradation protein 1	4	TLTGQDTMLK (12) AMFSGR (10)	22	<i>Mus musculus</i>
EGW00678	E3 Ubiquitin-protein ligase	20	AEEEVTAACGDELVR (20)	7	<i>Cricetulus griseus</i>
AAH61480	Senp6 protein	1	LTNPK (26)	36	<i>Mus musculus</i>
EGW01187	Sentrin-specific protease 6	1	HGRVK (10)	36	<i>Cricetulus griseus</i>
BAB29966	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 50	1	QEAAVR (25)	25	<i>Mus musculus</i>
NP_001101841	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	8	SANKR (17)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
BAB22959	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	2	GPVGK (12)	12	<i>Mus musculus</i>
EHB07633	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	6	AVSTGVKAPR (36)	36	<i>Heterocephalus glaber</i>
NP_037118	Ubiquitin-protein ligase	20	AEEEVTAACGDELVR (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
REORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO					
BAC35910	BTB	4	TLTGQDTMLK (10) AMFSGR (12)	22	<i>Mus musculus</i>
P18760	Cofilin-1	7	MASGVAVSDGVK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
P18760	Coronin	2	EPQR (5) GMGYMSK (5)	10	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAH98846	Pleckstrin	3	GIIK (10) QGCLLK (11)	21	<i>Rattus norvegicus</i>
AAC40083	Protein 4.1G	1	LEGGAAC (12)	64	<i>Mus musculus</i>

			TVLAK (26)		
			AQEAILK (26)		
EHB02652	Serine protease 4	14	DIQIIKD GK (22)	22	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAD13757	Tubby like protein 1	2	VPIRPR (10)	23	<i>Mus musculus</i>
EHB03773	Tubulin alpha chain	1	GNVAAK (9)	9	<i>Heterocephalus glaber</i>
TRANSDUÇÃO DE SINAL					
NP_665822	Phosphatidylinositol transfer protein 1	4	TGRGQLR (5) EGWR (5)	10	<i>Mus musculus</i>
AAC95468	Galanin receptor 2	2	TSQTM T T LSR (9)	9	<i>Mus musculus</i>
AAI20674	Gipr protein	3	LLPGGTK (11)	11	<i>Mus musculus</i>
CAA45276	Glutamate/aspartate transporter	1	MGSRMER (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA46650	Guanine nucleotide-binding protein G	1	NGYSK (10)	10	<i>Rattus norvegicus</i>
AAC15875	Protein tyrosine phosphatase type IVA 3	10	MARMNR (5) PAPVEVS YR (10)	15	<i>Mus musculus</i>
AAH67056	Rapgef2 protein	1	NMQK (5) VEEEGEIVMVK (10)	15	<i>Mus musculus</i>
AAH83893	Sel-1 suppressor of lin-12-like 2	1	NSEAER (11)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
BAB22798	TIMELESS-interacting protein	1	HQHKLK (6) LDAAR (17)	17	<i>Mus musculus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

- **Secretoma de mastócitos NÃO ativados**

TABELA 3 - Identificações das proteínas obtidas do Secretoma de mastócitos NÃO ativados.

Código de acesso	Identificação	% de Cobertura	MS/MS Peptide Sequence (Ion Score)	MASCOT score	Organismo
ADESÃO CELULAR					
BAD90476	Collagen EGF domain-containing protein 1	6	GPVGPPGAPGK (17)	25	<i>Mus musculus</i>
AAH05514	Gtpbp4-pending protein	1	QGPRMPR (29)	29	<i>Mus musculus</i>

NP_444356	Protocadherin beta 1	1	EPLLK (10) IPESTPLGSR (20)	20	<i>Mus musculus</i>
APOPTOSE					
ABC46642	ABL1	1	DLAAR (13) TEEAAEDVFK (7)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
EGV99948	Apoptosis facilitator Bcl-2	2	YSGDHLGR (18)	18	<i>Cricetulus griseus</i>
NP_068544	Endothelin converting enzyme-like 1	1	SDVSSVYNK (19)	37	<i>Rattus norvegicus</i>
BAB69457	p53-binding protein-3	1	LVPWLK (8)	20	<i>Mus musculus</i>
NP_080628	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	1	QMIKAQK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
BAB93548	Protein FAM32A	11	VLEAMGTSK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
NP_955750	Receptor interacting protein kinase 5	1	VPTLEIIRSSSGR (23)	23	<i>Rattus norvegicus</i>
AUTOPROTEÇÃO					
P17475	Alpha-1-antiproteinase	9	IVDLMK (13) MQHLEQTLTK (6) LSISGTYNLK (2) AVLTLDER (39) IVDLMK (13) MQHLEQTLTK (6) LSISGTYNLK (2) AVLTLDER (39)	91	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001033064	Alpha-1-antiproteinase 3	1	VVLVK (9) DTVVK (16)	34	<i>Rattus norvegicus</i>

			YGAATFSK (34)		
NP_001033064	Alpha-1-inhibitor 3 precursor	1	ADSHFR (8)	50	Rattus norvegicus
			EKDVYR (24)		
			LGHVSR (18)		
NP_001011892	Alpha-2-antiplasmin precursor	1	LPPLALLK (36)	36	Rattus norvegicus
NP_034113	Cathepsin D precursor	1	YSMQSSPK (25)	25	Mus musculus
AAB34982	Grp75	3	TTPSVVAFTPDGER (14)	29	Rattus norvegicus
			EMAGDNK (15)		
NP_766519	Heat shock transcription factor 3	5	SLLDR (10) VMPILKESK (20)	20	Mus musculus
AAL65910	SPI3C	1	MKGEK (19)	19	Mus musculus
NP_075757	Sulfhydryl oxidase 1 isoform b	1	AALDSRK (17)	17	Mus musculus
NP_997487	Toll-like receptor 6	1	LDFGVFLLNR (19)	29	Rattus norvegicus
ENDOCITOSE					
AAB60441	Asialoglycoprotein receptor 1	2	EDLLALR (20)	20	Mus musculus
NP_079792	Endoplasmic reticulum protein 3	1	IDLGK (23)	23	Rattus norvegicus
NP_061218	Golgin subfamily A member 4	1	MEMDEQMK (16)	44	Mus musculus
			QEAASMAK (19)		
			DELSRLGALLDER (9)		
NP_659144	Spartin isoform a	1	QVEEEK (8)	17	Mus musculus
			PGAGK (17)		
			LCHVFFTSLLETAR (8)		
EXOCITOSE					
AAM51176	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	2	FFIPR (19)	19	Mus musculus
AAB58428	Apolipoprotein A-I	4	VNADALR (49)	53	Rattus norvegicus
			LTEIK (4)		
			LTEIK (4)		

AAH38263	Apolipoprotein B-100	1	VELEVPQICGFIMR (9) YTMNRNK (16)	25	<i>Mus musculus</i>
NP_445770	Hemopexin precursor	2	ELISER (27) LYVTSGR (16)	43	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_444407	Mucolin-1	1	YLTFHFK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
BAB30322	Ran-binding protein 17	1	IDAVK (23) EAMQAGQR (4)	40	<i>Mus musculus</i>
NP_075757	Sulfhydryl oxidase	1	AALDSRK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
BAA07458	Transferrin	3	TVLPADGPR (13) IPSHAVVAR (54) VSTVLTAQK (11)	78	<i>Rattus norvegicus</i>
FUNÇÃO MASTOCITÁRIA					
AAA41489	Alpha-1-MAP	4	ATSQVVGVIYVIEFIAR (34)	34	<i>Rattus norvegicus</i>
P08649	Complement C4	1	NPSEPVPQAPALWIETTAYGLHLLLR (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH61739	Il17re protein	3	TLSCAAPR (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
P63005	Platelet-activating factor acetylhydrolase	5	EWIPR (26)	26	<i>Mus musculus</i>
AAB49282	Transcription factor Sox-M	1	SAHLDHR (24)	24	<i>Mus musculus</i>
NP_001101224	Tnf receptor-associated factor 6	1	MNLEAHLK (39)	39	<i>Mus musculus</i>
HOUSE KEEPING					
AAH23285	6430537H07Rik protein	2	SHGLIK (13)	13	<i>Mus musculus</i>
XP_003475291	Aminopeptidase	1	SGLACSNEVL (23)	20	<i>Cavia porcellus</i>
NP_766510	Ankyrin repeat	1	WMEQSTQK (13) QYIER (26)	26	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001041350	Arylsulfatase E	3	TPNIDR (7) LAEDGVR (13) EAKDFLR (10)	23	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_038799	ATP-dependent metalloprotease	1	SVDPEIAR (26)	26	<i>Mus musculus</i>

CAI92124	ATP-dependent RNA	1	NEVKIMDK (28)	28	<i>Mus musculus</i>
			MTSVAK (5)		
			VYYSQTTQTESPLVAPGIR (10)		
P49655	ATP-sensitive inward rectifie	11	DSTVR (5)	26	<i>Rattus norvegicus</i>
			YGDPEK (8)		
			LEESLR (8)		
NP_001012061	Cnksr family member 3	2	GEDALCR (22)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH22159	Cobyritic	3	PKIYTK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
			GHGRK (38)		
NP_001012061	Connector enhancer of kinase	2	GEDALCR (22)	60	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_034000	Cyclin-dependent kinase 4	1	EVSLPR (26)	26	<i>Mus musculus</i>
AAH79393	Cytoplasmic tRNA	1	FRAMLGK (18)	32	<i>Rattus norvegicus</i>
			MASDVTNNK (17)		
NP_001003959	DNA methyltransferase	2	GNLEDR (16)	35	<i>Rattus norvegicus</i>
			DWNMR (19)		
AAC52135	DNA topoisomerase lialpha	2	AAPKGTK (24)	24	<i>Mus musculus</i>
AAH53071	DNA-directed RNA	1	FGDIVER (19)	19	<i>Mus musculus</i>
			DEAEK (10)		
NP_997093	Dual specificity protein phosphatase	2	HLENSGK (20)	20	<i>Mus musculus</i>
NP_068544	Endothelin-converting enzyme	1	DVSSVYNK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_076094	F-box only protein 9	1	SSMLK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
			ALLLLHR (12)		
NP_291049	FK506-binding protein 6	3	EMCHR (19)	31	<i>Mus musculus</i>
EDL83568	G protein coupled receptor 108	2	TTMMSAVKEDQAK (21)	21	<i>Rattus norvegicus</i>
AAB41515	Galactoside 2-alpha-L	3	GVVADR (38)	38	<i>Rattus norvegicus</i>

AAI68903	Gba3 protein	3	AQFCSTFGDR (16)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
Q9JHD2	Histone acetyltransferase	1	QGFSKDIK (25)	25	<i>Mus musculus</i>
NP_001186084	KAT7	6	GFGTATEAATEPAGAPVPAGAAAAR (10) SNSNK (20)	30	<i>Mus musculus</i>
NP_783589	Histone cluster 1, H2aa	22	IGAGAPVYLAADVLEYLTAEVLELAGNAAR (31)	31	<i>Mus musculus</i>
NP_062242	Inter-alpha-inhibitor H4 heavy chain	2	QYTAAVGR (11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA58568	Inward rectifier	11	MTSVAKVYYSQTTQTESR (6) PLVAPGIR (10) DSTVRYGDPEK (8) LEESLR (8)	26	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH99932	Leucine carboxyl	6	YAIIGADLR (10) DLSELEEK (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_663730	Leucine-rich repeat isoform 2	5	LTVDLIAK (13) DLELLK (15)	28	<i>Mus musculus</i>
EDL39177	LIM homeobox	1	LDGLK (23)	23	<i>Mus musculus</i>
AAA41489	LMW T-kininogen	4	ATSQVVAGVIYVIEFIAR (34)	34	<i>Rattus norvegicus</i>
AAQ91064	LRRGT00108	1	MEKEAIK (9) TPMAYALR (19)	28	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_077378	Mannosyl glucosidase	1	VVGRPPPR (19)	19	<i>Mus musculus</i>
BAC98008	mKIAA0720 protein	1	MKEGK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
BAD32424	mKIAA1312 protein	2	LCGGGMR (22)	22	<i>Mus musculus</i>
NP_001074792	M-phase phosphoprotein 9	1	SNSVATSDVSR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
EHB06585	Muellerian inhibiting	1	GGGGAAR (27)	27	<i>Heterocephalus glaber</i>
BAC20283	Na/Pi cotransporter 4	5	EYILSSLDQQFNSEEQPLPIK (12)	24	<i>Rattus norvegicus</i>

			AMLK (24)		
			PVPK (18)		
EHB14246	N-acetyltransferase	3	QTNAPK (7)	22	<i>Heterocephalus glaber</i>
			NVNTR (5)		
EDL18235	NAD synthetase 1	2	FQLPVLQTK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
			EMPGDK (18)		
EDL77387	NEDD4-binding protein 2-like 2	3	LEMDTELSQFYK (2)	20	<i>Mus musculus</i>
NP_620228	Nibrin	1	MQNGLSSTLK (20)	20	<i>Mus musculus</i>
AAH89629	Nsmce4a protein	8	DEDRADIELIVYDSWK (25)	25	<i>Mus musculus</i>
			IRSSPR (18)		
EDL39695	Nuclear casein kinase and cyclin	7	GKAKVGR (17)	35	<i>Mus musculus</i>
			PTASK (27)		
CAB95737	Nuclear receptor-interacting protein 2	2	DEGDSR (15)	15	<i>Mus musculus</i>
			IRSSPREAK (18)		
NP_001139276	Nuclear ubiquitous casein	9	PTASK (27)	45	<i>Mus musculus</i>
AAK13445	Nucleolar GTP-binding protein 1	1	QGPMPR (29)	29	<i>Mus musculus</i>
			ATTPAK (12)		
EDL75577	Nucleolin	3	NDLAAVDVR (7)	30	<i>Mus musculus</i>
			SWLAR (8)		
NP_001099322	Otopetrin 3	2	HFSLLLR (17)	26	<i>Mus musculus</i>
AAA86825	Paraxis	4	DLGGCLK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
BAA14106	Peroxisomal 3-ketoacyl	1	FGISRQK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_722478	Peroxisomal protein	1	AAPHLR (19)	19	<i>Mus musculus</i>
			QWSTSSK (13)		
NP_001100609	Phosphatidylinositol transfer protein	2	GASPSR (9)	31	<i>Rattus norvegicus</i>
			TQTQMDLEQR (9)		
NP_848771	Phosphoinositide-interacting	4	FFLLNR (19)	19	<i>Mus musculus</i>

NP_081409	Protein lunapark	4	DASAPGGPPER (12) TVAPALPR (24)	24	<i>Mus musculus</i>
Q9QZ67	Protein phosphatase 1De	2	IEGLGGSVMNK (26)	26	<i>Mus musculus</i>
NP_001178757	Protein carboxyl-terminal domain	2	LGGMETVCK (10) VSQATPEFLR (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
EDM10957	Purkinje cell protein 4	12	HQEIMMGR (18)	18	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH18373	RNA binding motif protein 28	2	VLALPSHR (11) GPKIR (23)	23	<i>Mus musculus</i>
NP_001028580	RNA-binding protein 44	1	NSNAK (9) MAVK (9) EMNGVK (27)	27	<i>Mus musculus</i>
AAH38081	Rpusd3 protein	2	AAVVDQK (23)	23	<i>Mus musculus</i>
AAH89925	Sf3b1 protein	10	MGALEGLR (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH57305	Sfrs14 protein	3	YGDSEAVGEALHLK (8) AQDLLR (8) TGSR (24)	24	<i>Mus musculus</i>
NP_113939	SH3 1	1	IEYEQQPAAVPSMEK (11) EGGWQNEAR (17)	28	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_058917	Sonic hedgehog precursor	1	MLLLAR (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
AAL65910	SPI3C	1	MKGEK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
EDM15819	SRY-box containing gene 10	1	SAHLDHR (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001100976	Teashirt homolog 3	1	ASEEEEEK (17) YDISSK (34)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
AAD24467	Timeless protein small isoform	1	VVPRTTR (20)	20	<i>Mus musculus</i>
EHA97920	Trafficking kinesin	2	DLELAAR (18)	18	<i>Heterocephalus glaber</i>
EHB01483	Translation initiation factor	2	VLEAAMAAK (10)	21	<i>Heterocephalus glaber</i>

METABOLISMO ENERGÉTICO					
NP_038799	ATP-dependent metalloprotease	1	SVDPEIAR (26)	26	<i>Mus musculus</i>
NP_031845	Cytochrome P450 3A13	1	ETEIPLK (23)	23	<i>Mus musculus</i>
BAA98131	Acetylneuraminic	4	ECGADCAK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
EDL18235	NAD synthetase	2	FQLPVLQTK (17)	17	<i>Mus musculus</i>
NP_001100900	Pyruvate dehydrogenase	1	FGALQGSR (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
CAI79416	Rat sphingolipid	2	MGNRVSR (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
PROTEASSOMA					
AAA68612	BS4 peptide	3	LEQLECLDDAEK (27) GMGYSTQAAK(10)	37	<i>Mus musculus</i>
Q922B6	E3 ubiquitin-protein ligase	1	MNLEAHLK (39)	49	<i>Mus musculus</i>
BAA31563	E3 ubiquitin-protein ligase TTC3	1	HSCMQCVK (6) QGELMK (4) VTEHIVDEQK (16)	20	<i>Mus musculus</i>
NP_076094	F-box only protein 9	1	AGRSSMLK (19)	19	<i>Mus musculus</i>
AAG01032	Stat3-interacting protein	1	DLFLASCSQDCLIR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
NP_789818	F-box protein 16	2	EVTPDFK (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
REORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO					
NP_663715	Filamin A	1	NMMEKIK (18)	18	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001003669	keratin, type II cytoskeletal	1	GSSVDPR (27)	27	<i>Mus musculus</i>
NP_001101546	Myosin IF	2	FDGFAR (7) TIQKAWRR (4) PLPLTFSDMLQFR (17)	21	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_082297	Myosin-14	1	QACEK (14) LALGSR (7) ALEAEAAGLR (6)	31	<i>Mus musculus</i>

			AATLEEK (11)		
NP_035202	Profilin-1	5	TLVLLMGK (17)	17	Mus musculus
			DTEAMKR (8)		
AAB96843	Vinculin	2	ALASIDSK (9)	24	Mus musculus
			ILLVAK (15)		
TRANSDUÇÃO DE SINAL					
			GTDFQLNQLQGK(24)		
			DGGGDVAFVK (37)		
AAP92615	Ab2-417	6	SKDFQLFGSPLGK (18)	151	Rattus norvegicus
			DSAFGLLR (17)		
			ASDSSINWNNLK (34)		
			GDVAFVK (21)		
			TVLPADGPR (13)		
AAP92631	Ba1-667	2	IPSHAVVAR (54)	78	Rattus norvegicus
			VSTVLTAQK (11)		
			MEMDEQMK (16)		
AAH37641	Golga4 protein	3	QEAASMAK (19)	44	Mus musculus
			DELSRLGALLDER (9)		
			MEMDEQMK (16)		
NP_061218	Golgin subfamily A member 4	1	QEAASMAK (19)	41	Mus musculus
			DELSRLGALLDER (9)		
AAH05514	Gtpbp4-pending protein	1	QGPRMPR (29)	29	Mus musculus
AAH61739	Il17re protein	3	TLSCAAPR (20)	20	Rattus norvegicus
AAH23181	Pleckstrin homology	1	MKEGK (19)	19	Mus musculus
AAA19452	Signal transducer	1	HLTLREQR (27)	27	Mus musculus
AEO94941	Sphingosine-1-phosphate receptor 1	5	IMSCCTCPSGDSTGKFK (20)	20	Anomalurus beecrofti

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

- **Secretoma de mastócitos ATIVADOS**

TABELA 4 - Identificações das proteínas obtidas do Secretoma de mastócitos ATIVADOS.

Código de acesso	Identificação	% de Cobertura	MS/MS Peptide Sequence (Ion Score)	MASCOT score	Organismo
ADESÃO CELULAR					
AAD33913	Alpha-dystrobrevin 3	1	MIEDSGK (16)	16	<i>Mus musculus</i>
NP_446198	Contactin-5 precursor	1	GKNSFR (7) IELTPK (7)	14	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA64518	Dystrobrevin	1	MIEDSGK (16) MGMETLLVA (7)	16	<i>Mus musculus</i>
AAB61902	Liprin-beta-2	2	ATAGPR (1) LVLAVK (36)	44	<i>Mus musculus</i>
NP_032931	Liprin-beta-2 isoform 1	2	MGMETLL ANEDK (7) ATAGPR (1) LVLAVK (36)	36	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_080589	Luc7-like protein 3	27	GSDDKK (7)	156	<i>Mus musculus</i>
APOTOSE					
NP_001019504	Cell death activator	3	VVLVK (10) IVILK (11) FLFLK (8) HGIPFFVK (14) VTASPQSLCGLR (4)	13	<i>Rattus norvegicus</i>
Q8VIB2	Death domain	2	QLGPGPLGNSYVKK (14)	14	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001231727	Death-inducing DFFA-like	3	GPTLAPGR (13)	13	<i>Rattus norvegicus</i>

AAC53364	MAP kinase kinase 7	1	TGHIIAVK (16)	16	<i>Mus musculus</i>
AAC53365	MKK7b	2	TGHIIAVK (16)	16	<i>Mus musculus</i>
AUTO PROTEÇÃO					
AAA40628	Alpha-1-inhibitor 3	3	IDGQNLMTVGK (16)	47	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_113998	Beta-defensin 1 precursor	11	ICSSMK (6) MDKT (13)	13	<i>Mus musculus</i>
NP_071989	Beta-defensin 4 precursor	11	ICSSMK (6) MDKT (13)	13	<i>Mus musculus</i>
CAA41736	Cyclophilin CyP-S1	2	HVVFGK (22)	22	<i>Mus musculus</i>
NP_001013071	Defensin precursor	11	ICSSMKMDK (13)	13	<i>Mus musculus</i>
AAA41337	Hemopexin	13	GPDSVFLIK (17) DYFISCPGR (14) VYLIQGTQVYVFLTK (11) GGNNLVSGYPK (17) VDGALCLEK (5) SLPQPQK (5)	75	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_035279	Peptidyl-prolyl cis-trans	2	HVVFGK (22)	22	<i>Mus musculus</i>
AAI50695	Peptidyl-prolyl isomerase G	35	GIKVQRPR (7)	230	<i>Mus musculus</i>
AAM19102	PRP4 kinase	33	SLSPK (8) SRLRR (4) VTEREK (1) VHQLK (1)	172	<i>Mus musculus</i>
P09005	Serine protease inhibitor 2.1	4	VFSQQADLSR (46)	46	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_766185	Thioredoxin domain	1	LPTEMLR (5)	5	<i>Mus musculus</i>

NP_001073401	Tripartite	2	LQLQEVCMRKEK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
ENDOCITOSE					
AAP86279	Ac2-256	1	AVEPPKNAK (23)	23	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH40461	Golgb1 protein, partial	1	NGMHRK (11)	11	<i>Mus musculus</i>
AAF34662	Huntingtin interacting	1	LPEGPPNFLR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
EDL41030	Kinesin family	1	TRTLHDR (10)	10	<i>Mus musculus</i>
NP_703200	Leucine zipper	1	FGFSQDSGRGK(20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA41526	Lysosomal membrane	1	LGAVR (25)	25	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001104267	Piccolo isoform 2	1	TAKMMQR (11) HGSSK (5)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_598878	Protein kinase	1	GELARQIR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
NP_064483	Protein piccolo isoform 1	1	TAKMMQR (11) HGSSK (5)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001101020	Seizure 6-like	1	LGSPASATTK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
NP_001029193	TBC1 domain	1	VASPVNK (7)	7	<i>Rattus norvegicus</i>
EXOCITOSE					
EDL23172	Apolipoprotein C-IV	9	TRVMEMVK (9) PLVTRTK (10)	19	<i>Mus musculus</i>
AAH10194	Glyoxylate reductase	3	LLDAAGANLR (11)	11	<i>Mus musculus</i>
NP_036772	Interphotoreceptor binding protein	2	VISSLSDPR (14)	14	<i>Rattus norvegicus</i>
FUNÇÃO MASTOCITÁRIA					
AAH99819	Leukotriene A4 hydrolase	8	TQHLHLR (10) SLTLDTK (12) GSPMEISLPALSK (17) LTYTAEVSVPK (6)	56	<i>Rattus norvegicus</i>

EEDLNSFSIEDLK (11)					
AAB59675	Leukotriene A-4 hydrolase	3	GFALLFYLEQLLGGPEVFLGFLK (39)	39	<i>Mus musculus</i>
AAB63448	MAP kinase kinase 7	2	TGHIIAVK (16)	16	<i>Mus musculus</i>
NP_001020043	NF-kappa-B-activating protein	40	EKKKKR (2) MEAV (3)	5	<i>Rattus norvegicus</i>
P22437	Prostaglandin G/H synthase 1	1	EVLNR (27)	27	<i>Mus musculus</i>
NP_001171190	Rab3 GDP/GTP exchange factor	1	HAKAGSRSR (9)	9	<i>Mus musculus</i>
AAL60520	RAR SOCS box containing protein	4	IVLLR (5) LPLPVALR (24)	29	<i>Mus musculus</i>
NP_446046	Receptor tyrosine phosphatase precursor	1	CVLYWPEK (16)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
Q2KHK9	Trans-acting transcription factor 7	1	DSTTTLGK (12)	12	<i>Mus musculus</i>
EGV95369	Transcription factor Sp7	1	DSTTTLGK (12)	12	<i>Cricetulus griseus</i>
EGV96442	Tyrosine-protein kinase	2	LAAFAGMTSSCPK (10) TSSCQTNGVATGDPK (15)	25	<i>Cricetulus griseus</i>
AAA64485	Tyrosine phosphatase R	1	CVLYWPEK (16)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
HOUSE KEEPING					
BAE23313	1700049G17Rik	1	NKSLMQHQK (18)	18	<i>Mus musculus</i>
AAH23285	6430537H07Rik protein	2	SHGLIK (13)	13	<i>Mus musculus</i>
AAA37332	Alpha-1 type I procollagen, partial	9	VGPPGPSGSPAEGSPGR (11) AAVPSGASTGIYEALRL (9)	1	<i>Mus musculus</i>
CAA36605	Alpha-enolase	12	TIAPALVSK (5) GVPLYR (5) IGAENVHNLK (8)	55	<i>Mus musculus</i>

			EAELELLK (13)		
			NPLAK (15)		
			WMEQSTQK (13)		
NP_766510	Ankyrin repeat and protein kinase	1	QYIER (13)	26	<i>Mus musculus</i>
EGW05331	Apolipoprotein C-IV	9	TRVMEMVKPLVTRTK (19)	19	<i>Cricetulus griseus</i>
			HQGVVMVGMGQK (12)		
NP_001099879	Beta-actin-like protein 2	11	VAPDEHPILLTEAPLNPK (16)	64	<i>Rattus norvegicus</i>
			SYELPDGQVITIGNER (36)		
			WMEQSTQKQYIER (26)		
			GTDFQLNQLQGK (15)		
			IPSHAVVAR (45)		
			SKDFQLFGSPLGK (13)		
			DFQLFGSPLGK (19)		
			DSAFGLLR (44)		
			DSAFGLLR (17)		
AAP92642	Ccl-8	12	LYLGHSYVTAIR (34)	334	<i>Rattus norvegicus</i>
			LYLGHSYVTAIR (18)		
			GYAVAVVK (7)		
			GDVAFVK (28)		
			NTAAWAK (16)		
			DLLFR (15)		
			LPEGTTYEYLGAEYLQAVGNIR (25)		
			GDAGSADVQDLEK (6)		
AAH58624	Ccdc36 protein, partial	1	GGLLDRK (11)	11	<i>Mus musculus</i>
EDL04954	Cell division cycle 2-like 6	4	QTMDYDFK (6)	21	<i>Mus musculus</i>
			RKDGKDEK (15)		

NP_445979	Cell division cycle 2-like 6	5	QTMDYDFK (6)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
AAC34862	Cellular repressor of E1A-stimulated genes CREG	4	MAARAPELAR (14)	14	<i>Mus musculus</i>
BAD90476	Collagen and calcium-binding EGF	6	ASPMVPPPLPSRGGA (8) GPVGPPGAPGR (17)	25	<i>Mus musculus</i>
AAI37859	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B	2	TSKEGSVMGVTVSR (13) AACVLTTQTLMLLK (13)	26	<i>Mus musculus</i>
BAC26764	Disco-interacting protein 2 homolog B	2	TSKEGSVMGVTVSR (13) AACVLTTQTLMLLK (13)	26	<i>Mus musculus</i>
AAH40777	Dnm11 protein	1	SVTDSIR (29)	26	<i>Mus musculus</i>
AAB35506	DP3 protein	2	MIISTPQR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
AEP18543	Enamelin, partial	1	SKWGEEELSK (10) GSPTVR (8)	18	<i>Tamias striatus</i>
EGW13298	Gametogenetin-binding protein 1	1	ILAVR (14)	14	<i>Cricetulus griseus</i>
AAF63337	Guanine deaminase	6	TPQLALIFR (15) AFVGK (5) EIGNFEVGK (10) FLYLGDDR (30)	30	<i>Rattus norvegicus</i>
CAM14869	Guanine nucleotide binding protein-like 3	11	PARQNGK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
AAH79653	Guanine nucleotide binding protein-like 3	1	PARQNGK (14)	11	<i>Mus musculus</i>
EGV94283	Histone H2A type 1	10	VGAGAPVYLAADVLEYLTAEILELAGNAAR (34) AKAAKPK (3)	36	<i>Cricetulus griseus</i>
EHB10176	Importin-8	1	QKEYIAPR (7) TAVELAK (20)	27	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAK62262	Interphotoreceptor binding protein	2	VISSLSDPR (14)	11	<i>Rhizomys pruinosus</i>

NP_001178761	Interphotoreceptor binding protein	2	VISSLSDPR (14)	14	<i>Rattus norvegicus</i>
AAA41360	IF1 protein	8	TREQLAALK (11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
ABV58177	Interphotoreceptor retinoid binding protein	1	PEAAR (17) VEAAR (12)	29	<i>Mus musculus</i>
AAF23886	Iroquois homeobox protein 4	1	EASTTLR (29)	29	<i>Mus musculus</i>
NP_703200	Leucine zipper putative tumor suppressor 1	1	FGFSQDSGRGK (20)	20	<i>Rattus norvegicus</i>
EHB06178	Leucine-rich repeat-containing G-protein	1	EPGKCR (10) CAVR (10)	20	<i>Heterocephalus glaber</i>
AAH79393	LOC292069 protein, partial	1	FRAMLGK (12)	12	<i>Rattus norvegicus</i>
AAS66278	LRRGT00187	3	LEGNRK (10)	10	<i>Rattus norvegicus</i>
BAC34600	MCG147415	6	GGRQGQR (11)	11	<i>Mus musculus</i>
EDL21553	mCG5142, isoform CRA_a	6	GFALLFYLEQLLGGPEVFLGFLK (39)	39	<i>Mus musculus</i>
CAB95737	Neuronal interacting factor X 1	2	DEGDSR (15)	15	<i>Mus musculus</i>
CAB95737	Nuclear receptor-interacting protein 2	2	DEGDSR (15)	15	<i>Mus musculus</i>
EHB10723	p21-activated protein kinase	1	GLGSDSK (4)	4	<i>Heterocephalus glaber</i>
EHB17914	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G	67	GIKVQRPR (7) NSEKEDK (3) ERDVTK (9) EDEKTR (1)	318	<i>Heterocephalus glaber</i>
EGV96442	Protein D8Ert82e	2	LAAFAGMTSSCPK (10) TSSCQTNGVATGDPK (15)	25	<i>Mus musculus</i>
CAA82957	Protein-tyrosine-phosphatase	1	CVLYWPEK (16)	16	<i>Mus musculus</i>
AAB03281	rCRMP-3, partial	2	TAQKIMAPPGGR (12)	12	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001240845	Seizure 6-like protein isoform 1 precursor	1	LGSPASATTK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
AAH65117	Seizure related 6 homolog like	1	LGSPASATTK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
AAH14857	Sfrs7 protein	4	SRFDR (5) PPAR (6)	11	<i>Mus musculus</i>

NP_604451	SH2B adapter protein 1 isoform 1	1	MPATSR (15)	15	<i>Rattus norvegicus</i>
AAI00156	SH3 domain containing ring finger 2	1	TKHLSLMSSPSRGK (27)	27	<i>Rattus norvegicus</i>
EH08425	Solute carrier family 22 member 23	1	TGLVQNVTVKVR (13)	13	<i>Heterocephalus glaber</i>
NP_445888	Staufen RNA binding	1	LYNPK (11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_001103377	Staufen RNA binding protein 2	1	LYNPK (11)	11	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH09076	Tagln2 protein	6	TLMNLGGLAVAR (42) TLMNLGGLAVAR (27)	42	<i>Mus musculus</i>
EGW07905	Thioredoxin domain-containing protein 16	1	LPTEMLR (5)	5	<i>Cricetulus griseus</i>
AAH49168	TMF1-regulated nuclear protein 1	4	LAHRAESLSR (6)	6	<i>Mus musculus</i>
EDM12036	Transaldolase	20	LFVLFGAELK (11) IPGRVSTEVDARCVGSVGR (8)	19	<i>Mus musculus</i>
AAG43169	Transaldolase	6	IIELYK (15) TIVMGASFR (12) LAPTLVK (6)	33	<i>Rattus norvegicus</i>
AAD37787	Transgelin	5	TLMNLGGLAVAR (42) TLMNLGGLAVAR (27)	42	<i>Mus musculus</i>
AAH84703	Transgelin 2	10	GVSQPQGR (10) TLMNLGGLAVAR (42)	79	<i>Rattus norvegicus</i>
EGW00439	Transmembrane protein 130	3	IGPEPLGTHPRCAMA (31)	31	<i>Cricetulus griseus</i>
EGW12375	Transmembrane protein 134	7	GHRGFQFFYLPYFEK (8) GFQFFYLPYFEK (10)	18	<i>Cricetulus griseus</i>
NP_001129186	Tripartite motif-containing protein 65	2	NLTFDPETANR (26)	26	<i>Rattus norvegicus</i>
EGW03252	Tripartite motif-containing protein 72	2	LQLQEVCMRK (14)	14	<i>Cricetulus griseus</i>
NP_064301	Vomeroneasal type-2 receptor 26	1	FPYLYQMAPK (11)	11	<i>Mus musculus</i>
NP_543131	Zinc finger CCHC domain-containing protein 14	1	LLSSSMHSLLSLEER (29)	29	<i>Mus musculus</i>
NP_001092798	Zinc finger protein 831	1	GTPDSIPR (16) SIRKRSLEGMR (10)	26	<i>Mus musculus</i>

NP_001014087	Zinc finger CCHC domain	1	LLSSSMHSLLSLEER (29)	29	<i>Rattus norvegicus</i>
METABOLISMO ENERGÉTICO					continuação para as demais
AAN75571	1-acylglycerolphosphate	2	VLSALMPAR (14)	14	<i>Mus musculus</i>
AAK68636	Adiponutrin	1	ASKDDHR (13)	13	<i>Mus musculus</i>
CAA36605	Alpha-enolase	7	TIAPALVSK (5) GVPLYR (5) IGAENVYHNLK (8) EAELELLK (13)	32	<i>Mus musculus</i>
ACD76770	Cytochrome b	1	MPIMR (27)	27	<i>Handleyomys intectus</i>
AAH03891	Enolase 1, alpha non-neuron	7	TIAPALVSK (5) GVPLYR (5) IGAENVYHNLK (8) EAELELLK (13)	32	<i>Mus musculus</i>
NP_001102366	Glutaryl-CoA	2	GVAAR (10) LLSR (7)	17	<i>Rattus norvegicus</i>
NP_062240	Lysosomal thioesterase	2	LLMPAAPAPHR (22)	22	<i>Rattus norvegicus</i>
BAE41642	Peroxisomal acyl-coenzyme	1	SKEVAR (23)	23	<i>Mus musculus</i>
AAG43169	Transaldolase	6	IIELYK (15) TIVMGASFR (12) LAPTLSVK (6)	33	<i>Rattus norvegicus</i>
PROTEASSOMA					
Q8VIB2	Death domain-associated protein 6	2	QLGPGPLGNSYVK (14)	14	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH79653	Guanine nucleotide binding protein-like 3	1	PARQNGK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
EDL26821	Proteasome subunit	3	ALPLSSPR (33)	33	<i>Mus musculus</i>
AAI00156	SH3 domain containing ring finger 2	1	TKHLSLMSSPSRGK (27)	27	<i>Rattus norvegicus</i>
REORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO					

AAH03337	Actin	22	AGFAGDDAPR (30)	118	<i>Mus musculus</i>
			HQGVMMVGMGQK (12)		
			DSYVGDEAQS(8)		
			VAPEEHPVLLTEAPLNPK (15)		
			SYELPDGQVITIGNER (36)		
			EITALAPSTMK (10)	continuação para as demais	
			IIAPPER (7)		
EHB10352	14-3-3 protein	2	EALAAG (30)	30	<i>Heterocephalus glaber</i>
EHB10352	Actin, alpha skeletal	7	AGFAGDDAPR (30)	42	<i>Rattus norvegicus</i>
			DSYVGDEAQS(8)		
			IIAPPER (7)		
AAI11905	Actin, beta-like 2	13	HQGVMMVGMGQK (12)	36	<i>Mus musculus</i>
			VAPDEHPILLTEAPLNPK (16)		
			SYELPDGQVITIGNER (36)		
			IIAPPER (7)		
NP_031419	Actin, cytoplasmic 1	7	AGFAGDDAPR (30)	42	<i>Mus musculus</i>
			DSYVGDEAQS(8)		
			IIAPPER (7)		
NP_033739	Actin, cytoplasmic 2	7	AGFAGDDAPR (30)	45	<i>Mus musculus</i>
			DSYVGDEAQS(8)		
			IIAPPER (7)		
AAH03337	Actin gamma	22	AGFAGDDAPR (30)	38	<i>Mus musculus</i>
			HQGVMMVGMGQK (12)		
			DSYVGDEAQS (8)		
			VAPEEHPVLLTEAPLNPK (15)		
			SYELPDGQVITIGNER (36)		
			EITALAPSTMK (10)		

BAB25561	Actin complex	4	AQGVVLK (14)	14	<i>Mus musculus</i>
ADI96116	Alpha dystroglycan	1	GVSTPAR (17)	17	<i>Mastomys erythroleucus</i>
CAA24528	Beta-actin	7	AGFAGDDAPR (30) DSYVGDEAQSK (8) IIAPPER (7)	42	<i>Rattus norvegicus</i>
BAC26303	Beta-actin-like protein 2	11	HQGVVMVGMGQK (12) VAPDEHPILLTEAPLNPK (16) SYELPDGQVITIGNER (36)	64	<i>Mus musculus</i>
AAH42459	Cgn protein, partial	1	QLAALREEADR (7)	7	<i>Mus musculus</i>
AAH11068	Coactosin-like protein	19	AAYNLVR (13) LFAFVR (5) EFVISDR (21) ELEEDFIR (18)	78	<i>Mus musculus</i>
AAH11068	CotI1 protein	19	AAYNLVR (13) LFAFVR (5) EFVISDR (21) ELEEDFIR (18)	54	<i>Mus musculus</i>
AAH96422	Cytoskeleton associated protein	1	APGVSSKAKSVQ GK (13) TQNINSNANMLRK (10)	23	<i>Mus musculus</i>
AAB03281	Dihydropyrimidinase	2	TAQK (6) IMAPPGGR (12)	12	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA64518	Dystrobrevin alpha	1	MIEDSGK (16)	6	<i>Mus musculus</i>
EDL93793	Microtubule-associated protein 7	3	NGNSR (10)	10	<i>Rattus norvegicus</i>
EDL88431	Nucleoside phosphorylase	6	FEVGDIMLIR (26) VFGFSLITNK (12)	38	<i>Rattus norvegicus</i>

CAA32586	Profilin-1	20	SSFFVNGLTLGGQK (14) DSLLQDGEFTMDLR (14)	28	<i>Mus musculus</i>
AAC06353	SH2	1	GSLVK (8)	8	<i>Mus musculus</i>
NP_446121	SH2B adapter protein 2	1	MPATSR (15)	15	<i>Rattus norvegicus</i>
CAA34187	Thymosin beta-4	26	NPLPSK (22) ETIEQEK (19)	41	<i>Mus musculus</i>
AAH70421	Tropomyosin 4	12	DEEKMEILEMQLK (8) YEEEIKLLSDK (15)	23	<i>Mus musculus</i>
CAM13863	Tubulin tyrosine	4	ARMLPSTQTKVLK (23)	23	<i>Mus musculus</i>
NP_031418	Vascular alpha-actin	7	AGFAGDDAPR (30) DSYVGDEAQS(8) IIAPPER (7)	45	<i>Rattus norvegicus</i>
TRANSDUÇÃO DE SINAL					
EGW09281	Axin-2	1	STETVENGFR (5)	5	<i>Cricetulus griseus</i>
			TVLPADGPR (32)		
			GTDFQLNQLQGK (15)		
			SKDFQLFGSPLGK (13)		
			DSAFGLLR (44)		
			DSAFGLLR (17)		
AAP92631	Ba1-667	11	LYLGHSYVTAIR (34) LYLGHSYVTAIR (18) EGVCPEGSIDSAPVK (36) GYYAVAVVK (7) GDVAFVK (28) DLLFR (15)	283	<i>Rattus norvegicus</i>
AAC06353	Cytoplasmic protein NCK2	1	GSLVK (8)	8	<i>Mus musculus</i>

CAA68287	Estrogen receptor	1	GNMIMESAK (21)	21	<i>Rattus norvegicus</i>
EHB13422	G protein-coupled	1	GGGKR (5) QSQLLTK (5)	28	<i>Heterocephalus glaber</i>
NP_766259	Leucine-rich	1	EPGKCRC AVR (20)	20	<i>Mus musculus</i>
BAC34065	Potassium channel	1	ISLAK (25)	25	<i>Mus musculus</i>
NP_598878	Protein kinase	1	GELARQIR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
NP_446046	Receptor-type tyrosine	1	CVLYWPEK (16)	16	<i>Rattus norvegicus</i>
AAI38456	Spata13 protein	1	DPEPSR (4) TNVIQEIMNTERVYIK (10)	14	<i>Mus musculus</i>
AAF76252	Titin	28	ATNDAGSALCTSSIVIKEPK (2) VPAEVVEIEEPPPTK (4) DIETMEK (5) TVTTKCSK (13) YKLSKDK (15)	39	<i>Rattus norvegicus</i>
AAG43169	Transaldolase	11	LFVLF GAEILK (11) IIELYK (15) TIVMGASFR (12) LAPTLSVK (6) LSDGIR (7)	51	<i>Rattus norvegicus</i>
EGW14001	Vomeronasal type-2	1	FPYLYQMAPK (11)	11	<i>Cricetulus griseus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

5.3 As proteínas de função mastocitária

Em posterior a identificação das proteínas fez-se necessário uma análise da função das proteínas classificadas como **função mastocitária** (Tabelas 1 a 4). Foram observados os domínios celulares e moleculares, a localização tecidual, bem como conjuntos de eventos moleculares pertinentes para o funcionamento integrado das proteínas às células, tecidos, órgãos e organismos. Para melhor entendimento do sistema biológico, as proteínas foram descritas pela ferramenta Gene Ontology, possibilitando a visualização e compreensão das interações moleculares e redes de reação em mapas metabólicos.

- **Endoproteoma de mastócitos Não ativados (resultados apresentados na Tabela 1)**

Cannabinoid receptor 2: receptor de proteína G heterotrimérica para Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, que media a inibição da adenilato-ciclase. Está relacionada à resposta inflamatória e manutenção da homeostase (JORDA et al., 2002, p. 2786-2793).

Phosphatidylethanolamine-binding protein 4: está relacionada à resistência celular e a inibição do processo apoptótico induzido por Tumor necrosis factor. Atua por inibição da via treonina quinase Raf-1 (CARNINCI et al., 2005, p. 1559-1563).

Rho/rac-interacting citron kinase: associada ao complexo RHO efetor Ras-related (RAC), que se liga às formas do Guanosina trifosfato (GTP) e Ras-related 1. Esta proteína possui atividade de quinase catalisando sua autofosforilação e a fosforilação de substratos exógenos nos resíduos de serina / treonina e tirosina (CUNTO et al., 1998, p. 29706-29711).

TNF receptor-associated factor 3: regula a ativação do Factor nuclear kappa B e MAP quinases, e regula a sobrevivência de células-B. Parte da via de sinalização conduz à produção de citocininas e a degradação proteossomal de NF-kappa-B-inducing kinase (TSENG et al., 2010, p. 70-75).

TRAF6: ativa as moléculas Mitogen-activated protein kinase (MAP) e Factor nuclear kappa B (NF-κB). Pode estar associada com a formação de osteoclastos funcionais. Juntamente com MAP3K8, medeiam sinais de TNF receptor superfamily member 5 que ativam Extracellular-signal-regulated kinases nas células B e nos macrófagos, e, assim, desempenham a regulação na produção de imunoglobulina (ISHIDA et al., 1996, p. 28745-28748).

- **Endoproteoma Ativado (resultados apresentados na Tabela 2)**

Phosphatidylinositol 4,5 phosphodiesterase: a produção secundária do mensageiro molecular de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) é mediada por enzimas específicas de fosfatidilinositol-fosfolipase C. Está relacionada a via de sinalização da proteína G, bem como a resposta a prostaglandina F (ELLIS et al., 1998, p.11650-11659).

Ankyrin repeat and SOCS box protein 14: é componente do substrato de reconhecimento da proteína Elongin-Cullin-SOCS-box (SFC) e da E3 complexo ubiquitina ligase (ECS), assim medeiam a ubiquitinação e degradação proteossomal (KILE et al., 2002, p. 235-241).

Carboxypeptidase A: as proteases são as principais proteínas constituintes dos grânulos de mastócitos, e podem ser representadas por três famílias de preteases armazenadas como: Triptases, CHY-Mases e carboxipeptidase A, sendo liberadas após a ativação dos mastócitos. A carboxipeptidase cliva os resíduos de aminoácidos aromáticos e alifáticos (COOH)-terminais, assim como converte a angiotensina I em angiotensina II. Além disso, pode unir a bradicinina e substância P (GARDELL et al., 1988, p. 17828-17836).

C-C motif chemokine e C-C motif chemokine 24: as quimiocinas são citocinas quimiotáticas que regulam a migração de células. Elas também promovem a adesão pela expressão de integrinas e estimulam a liberação de mediadores inflamatórios. A ligação de quimiocinas aos seus receptores em mastócitos tem mostrado induzir a migração de exocitose ou desgranulação. A ação das quimiocinas e dos receptores de quimiocina expressos pelos mastócitos está relacionado ao controle das respostas durante a inflamação e infecção (FLOREA et al., 2005, p. 54-66).

Fibroblast growth factor 15 precursor; Fibroblast growth factor receptor 2; Growth/differentiation factor 11 e Inhibin alpha-subunit precursor: são proteínas responsáveis pela sinalização de fibroblastos, além de realizar a regulação positiva Da cascata de C-Jun N-terminal kinases (JNK) e a regulação de ERK1 e ERK2. A ativação de Phospholipase C gamma 1 (PLCG1) leva à produção do celular moléculas sinalizadoras diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato. A fosforilação de Fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRF2) desencadeia recrutamento de Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), GRB2-associated-binding protein 1(GAB1), Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha (PIK3R1) e Son of sevenless

homolog (SOS1), e medeia a activação da RAS, MAPK1/ERK2, MAPK3/ERK1 e de sinalização da MAP cinase, bem como da via de sinalização AKT1. Sinalização FGFR2 é regulada por ubiquitinação, internalização e degradação (GREEN et al., 1996, , p. 639-646).

Interferon alpha 3; Interferon gamma receptor beta subunit; Interferon alpha responsive protein; Interleukin 33 precursor e Interleukin-1 receptor kinase 1 splice form 3: Os mastócitos são uma fonte de muitas citocinas e quimiocinas multifuncionais, tais como IL-1, -2, -4, -5, -6, TNF- α . As citocinas desempenham função crítica na fase tardia de eventos inflamatórios. A IL-1 aumenta o crescimento de células T auxiliares e o crescimento e proliferação de células B, enquanto que a IL-2 faz a proliferação de linfócitos T e a ativação dos linfócitos B. IL-4 faz com que a diferenciação dos linfócitos B nas células plasmática, juntamente com a de TNF- α , regula positivamente tanto de alta e baixa afinidade de expressão do receptor de IgE em células apresentadoras de antígenos IL-5 provoca a ativação dos linfócitos B e a diferenciação e aumento da longevidade dos eosinófilos, e IL-6 provoca aumento da síntese e secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos (LU et al., 2008, p. 445-457).

Macrophage colony stimulating factor 1: esta proteína é uma citocina que desempenha função na regulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas, especialmente os fagócitos mononucleares, tais como macrófagos e monócitos e mastócitos. Promove a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias, e assim realiza um papel importante na imunidade inata e em processos inflamatórios (SWEET et al, 2004, p. 169-177).

NF-kappa-B inhibitor alpha: inibe a atividade dos complexos NF-kappa-B no citoplasma por meio da sinalização celular. São proteínas relacionadas à estimulação celular para respostas imunitárias e pró-inflamatórias (TEWARI et al., 1992, p. 603).

Phospholipase A2; Phospholipase A2, group IVB; Phospholipase C-beta 4 e PRKC: a partir da liberação de membranas celulares através da ação de fosfolipase A2, ou pela ação da fosfolipase C e diacilglicerol lipase, o ácido araquidônico é convertido por 5-lipoxigenase para 5S-hidroperoxi-6, 8-trans-11,14-cis-eicosatetraenoico e o mesmo caminho 5-lipoxigenase, catalisando a conversão de 5S-hidroperoxi-6, 8-trans-11, 14-cis-ácido para eicosatetraenoico (LT4) (DENNIS, 1994, p.13057-13060).

Ras-related protein Rab-13: as GTPases Rab são reguladoras do tráfico intracelular da membrana, a partir da formação de vesículas de transporte para a sua fusão com as membranas. A Rab está envolvida na endocitose e regula o transporte para

a membrana plasmática de proteínas transmembranares tais como a proteína de junção (WU et al., 2011, p. 23511-23520).

Receptor tyrosine kinase EphA1: este receptor de tirosina quinase se liga com elevada afinidade a Ephrin-A1 (EFNA1). Após a ativação ocorre a indução da fixação das células à matriz extracelular, inibindo a motilidade de outras células inflamatórias para o local (DUFFY, 2008, p. 553-561).

Regulator of G-protein signaling 9: regula a via de sinalização da proteína G através de receptores acoplados. Possui função fundamental na transdução de sinal intracelular (SANTOS et al., 2012, p. 2682–2693).

Serine/threonine-protein kinase PLK2: desempenha fundamental regulação das proteínas sinalizadoras Ras related protein. A degradação pelo proteassomal se inicia através da fosforilação da Guanine nucleotide exchange factor (MA et al., 2003, p. 376-384).

Serpin peptidase inhibitor: esta protease cliva a serpina no local reativo da molécula, estabelecendo uma ligação covalente entre o grupo carboxila do local reativo serpina e o hidroxilo da serina protease. É atuante em respostas inflamatórias, preponderantemente na fase aguda, bem como respostas as induções feitas pela liberação de citocinas (CHAO et al., 1990, p. 323-329).

Sox14 protein: esta proteína é um fator de transcrição que confere especificidade para as células quanto ao seu desenvolvimento e diferenciação (KAMACHI et al, 2013, p. 4129-4144).

TNF receptor-associated factor 7: a Ubiquitina ligase E3 realiza a autoubiquitinação, após fosforilação por MAP3K3. Potencializando a ativação de Mitogen-activated protein kinase 3 mediada por NF-kappa-B, Activator protein (AP1) e Damage-inducible transcript 3 (DDIT3), ambos reguladores de transcrição (SCUDIERO et al., 2012, p. 6053-6061).

- **Secretoma de mastócitos Não ativados (resultados mostrados na Tabela 3)**

Alpha-1-MAP: glicoproteína atuante como precursor da bradicinina, efetuando a contração muscular, indução de hipotensão e aumento da permeabilidade vascular (MIYAKE et al, 2007, p. 2765-2776).

Complement C4: derivado da degradação proteolítica de complemento C4, C4a anafilotoxina é um mediador de processos inflamatórios locais. Ela induz a contração do músculo liso, aumenta a permeabilidade vascular e provoca a liberação de histamina a partir de mastócitos e leucócitos basófilos (FIMMEL et al, 1996, p. 2601-2609).

IL17re protein: receptor funcional específico para IL17C, sinalizando através das NF-kappa-B e MAPK. Esta proteína é reguladora da imunidade inata a patógenos bacterianos (AKDIS et al, 2011, p. 701-721).

Platelet-activating factor acetylhydrolase: ativa as moléculas GTPases Rho e polimeriza os filamentos de actina. Pode também desempenhar um papel em outras formas de locomoção de células, incluindo a migração de fibroblastos durante a cicatrização de feridas (SMITH et al, 2000, p. 767-775).

Transcription factor Sox-M: fator de transcrição que confere especificidade para as células quanto ao seu desenvolvimento e diferenciação (KAMACHI; KONDOH, 2013, p. 4129-4144).

Tnf receptor-associated factor 6: media a ativação do NF-kappa-B que leva à ativação MAP3K7, é também um adaptador de proteína que está relacionada a transdução do sinal iniciada por meio de receptores de TNF, IL-1 e do receptor de IL-17 do receptor. Juntamente com MAP3K8, medeiam sinais de CD40 que ativam ERK em células B e macrófagos, e, assim, regulam a produção de imunoglobulina (FRANSEN et al, 1985, p. 4417-4429).

• **Secretoma de mastócitos Ativados (resultados mostrados na Tabela 4)**

Complement C4: derivado de degradação proteolítica de complemento C4, C4a anafilotoxina é um mediador de processos inflamatórios locais. Ela induz a contração do músculo liso, aumenta a permeabilidade vascular e provoca a liberação de histamina a partir de mastócitos e leucócitos basófilos (FIMMEL et al, 1996, p. 2601-2609).

Leukotriene A4 hydrolase: leucotrienos são derivados de ácido araquidônico, que é disponibilizado a partir de fosfolipídios da membrana da célula através da ação de fosfolipase A2 ou pela ação da fosfolipase C e diacilglicerol lipase. A partir da liberação de membranas celulares através da ação de fosfolipase A2, o ácido araquidônico é convertido por 5-lipoxigenase para 5S-hidroperoxi-6, 8-trans-11,14-cis-eicosatetraenóico, formando Leukotriene A4 hydrolase (LTA4). O LTA4 pode então ser convertido para Leucotrieno C4 (LTC4) a partir Da reação com conjugados com a

glutathiona reduzida. Nas fases posteriores da reação alérgica, após o transporte para o meio extracelular, o LTC₄ pode se modificar para Leucotrieno D₄ (LTD₄) e Leucotrieno E₄ (LTE₄) (NEWMAN et al, 2005, p. 1-51).

MAP kinase kinase 7: proteína quinase que atua na via de transdução de sinal especificamente das proteínas JNK previamente ativadas por citocinas pró-inflamatórias. A via de sinalização MKK / JNK está envolvida na sinalização de morte via mitocondrial, incluindo a liberação do citocromo c, que conduz à apoptose (MORIGUCHI et al, 1997, p. 7045-7053).

NF-kappa-B-activating protein: inibe a atividade dos complexos NF-kappa-B no citoplasma por meio da sinalização celular. São proteínas relacionadas à estimulação celular para respostas imunitárias e pró-inflamatórias (SE; BALTIMORE, 1986, p.705-716).

Prostaglandin G/H synthase 1: um grupo de moléculas derivadas do ácido araquidônico, que medeiam às reações alérgicas. O produto da ciclooxigenase mais abundante gerado pela ativação imunológica de mastócitos. Os efeitos biológicos das prostaglandinas geradas durante as reações alérgicas incluem a modulação da contratilidade do músculo liso, a permeabilidade vascular, sensação de prurido e dor. A Prostaglandin G/H synthase converte o araquidonato a prostaglandina H₂ (PGH₂), uma etapa relacionada à síntese de prostanóides. Para as células, é fundamental a liberação de prostaglandinas, tais como a prostaglandina E₂ (PGE₂), a qual realiza função na citoproteção. Nas plaquetas, está envolvida na geração de tromboxano A₂ (TXA₂), que promove a ativação e agregação das plaquetas, vasoconstrição e proliferação de células musculares lisas vasculares (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011, p.986-1000).

Rab3 GDP/GTP exchange factor: regula a proliferação, sobrevivência e morte celular. Converte a forma inativa ligada a GDP de RAB3A, RAB3C e RAB3D às formas ativas GTP. É parte componente do complexo TNFRSF1A sinalização com ativação da MAP quinase. Desempenha a função de regulador na morte celular induzida por TNF-alfa, a apoptose mediada por caspases (WADA et al, 1997, p. 3875-3878).

RAR SOCS box containing protein: parte componente do substrato do reconhecimento de uma ECS SCF-like complexo ubiquitina ligase E3 que medeia a ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal de proteínas-alvo (KAMACHI et al, 2013, p. 4129-4144).

Receptor tyrosine phosphatase precursor: Esta proteína inativa as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como MAPK1, MAPK3 e MAPK14 no citoplasma (LEMMON; SCHLESSINGER, 2011, p. 1117-1134).

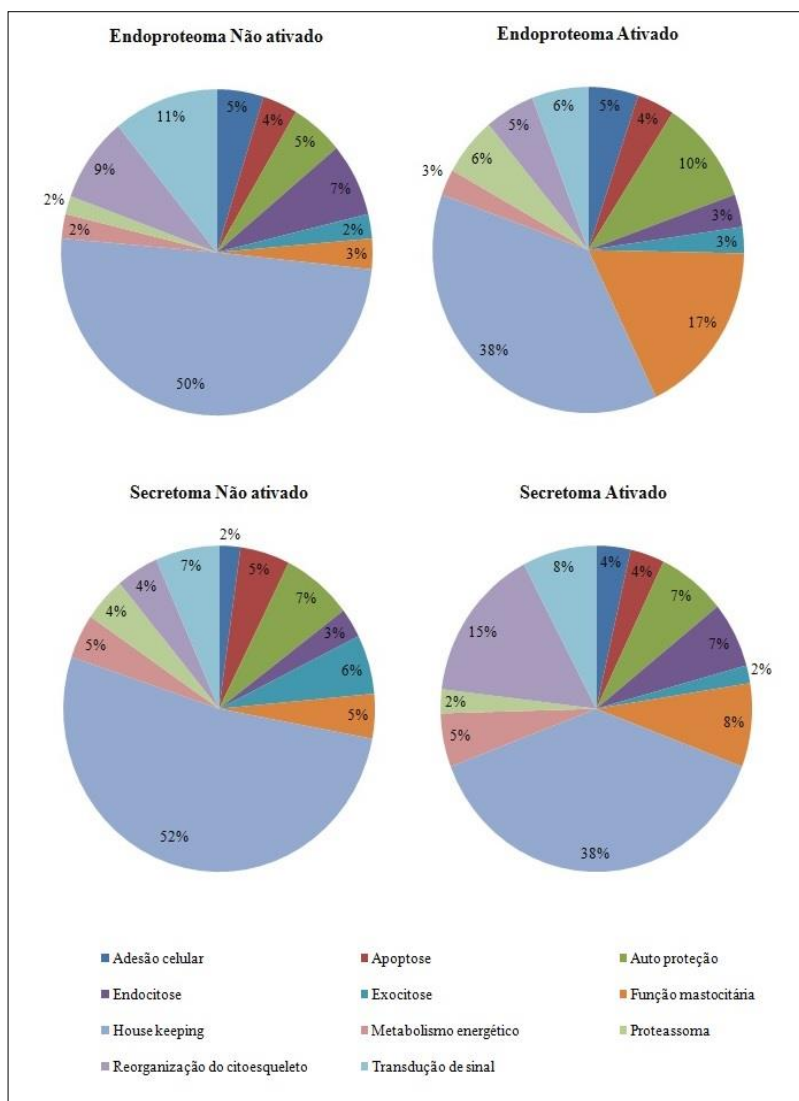
Trans-acting transcription factor 7 e Transcription factor Sp7: E3 ubiquitina ligase capaz de autoubiquitinação, após fosforilação por MAP3K3. Potencializa ativação MEKK3-mediada da NF-kappa-B, JUN/AP1 e DDIT3 reguladores de transcrição (LEMMON; SCHLESSINGER, 2011, p. 1117-1134).

Tyrosine-protein kinase e Tyrosine phosphatase R: este grupo de proteínas degrada as quinases ativadas por (MAPKs), como MAPK1, MAPK3 e MAPK14 no citoplasma em uma forma inativa. As MAPKs se ligam a uma cinase de desfosforilado acarretando a liberação dos complexos MAPKs para a ativação e a translocação da molécula (LEMMON; SCHLESSINGER, 2011, p. 1117-1134).

5.4 Perfil geral do proteoma funcional mastocitário

Após os dados terem sido analisados, os gráficos abaixo foram gerados (Gráfico 2). Estes gráficos analisam o perfil geral encontrado nos grupos de estudo: Endoproteoma Não ativado, Endoproteoma Ativado, Secretoma Não ativado e Secretoma Ativado. Foram descritas as porcentagens relativas de cada categoria (adesão celular, apoptose, autoproteção, endocitose, exocitose, house keeping, metabolismo energético, proteassoma, função mastocitária, reorganização do citoesqueleto, e transdução de sinal) em relação ao número absoluto de cada grupo.

Gráfico 2 - Perfil geral do proteoma funcional mastocitário ativado e não ativado pelo mastoparano.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014). Os gráficos correspondem ao perfil dos grupos: Endoproteoma Não ativado, Endoproteoma Ativado, Secretoma Não ativado e Secretoma Ativado.

Os grupos denominados por Endoproteoma Não ativado e Endoproteoma Ativado foram analisados simultaneamente, de modo que os dados obtidos de cada grupo foram contabilizados e comparados em cada categoria de função biológica. Os valores abaixo representam o número absoluto proteínas identificadas em cada grupo funcional.

Endoproteoma Não ativado: Adesão celular: 8; Apoptose: 6; Autoproteção: 9; Endocitose: 12; Exocitose: 4; Função mastocitária: 5; House keeping: 82; Metabolismo

energético: 4; Proteassoma: 3; Reorganização do citoesqueleto: 14; Transdução de sinal: 18. Contabilizando um total de 165 proteínas presentes em 6450 µg de proteínas totais analisadas.

Endoproteoma Ativado: Adesão celular: 8; Apoptose: 6; Autoproteção: 16; Endocitose: 5; Exocitose: 4; Função mastocitária: 27; House keeping: 58; Metabolismo energético: 4; Proteassoma: 9; Reorganização do citoesqueleto: 8; Transdução de sinal: 9. Contabilizando um total de 154 proteínas presentes em 6450 µg de proteínas totais analisadas.

Ao serem comparados os números absolutos, bem como as porcentagens demonstradas nos gráficos, observa-se que o grupo sensibilizado pelo mastoparano possui proteínas relacionadas com a maquinaria funcional dos mastócitos, apresentando menor número de proteínas relacionadas à ações generalistas dentro da célula como housekeeping. Sendo esta, muito bem acentuada nos dados encontrados, que quando comparados, apresentam 17% no ativado e apenas 3% no grupo não ativado. Estes números são afirmativos para o fato de que os mastócitos foram ativados pelo mastoparano, e iniciou seu processo de desgranulação. Outro ponto a ser discutido, foi o aumento no número de proteínas relacionadas à autoproteção, o que pode ser justificado com a presença das proteases neutras identificadas, atuando frente à ação citotóxica do mastoparano. Além do mais, houve aumento considerável de proteínas associados à função de proteassomas, permitindo inferir que muitas proteínas do grupo ativado estão sendo ubiquitinadas, para então serem degradadas.

Os grupos denominados por Secretoma Não ativado e Secretoma Ativado foram analisados simultaneamente, de modo que os dados obtidos de cada grupo foram contabilizados e comparados em cada categoria de função biológica. Os valores abaixo representam o número absoluto proteínas identificadas em cada grupo funcional.

Secretoma Não ativado: Adesão celular: 3; Apoptose: 7; Autoproteção: 10; Endocitose: 4; Exocitose: 8; Função mastocitária: 6; House keeping: 71; Metabolismo energético: 6; Proteassoma: 6; Reorganização do citoesqueleto: 6; Transdução de sinal: 9. Contabilizando um total de 136 proteínas presentes em 3000 µg de proteínas totais analisadas.

Secretoma Ativado: Adesão celular: 6; Apoptose: 6; Autoproteção: 12; Endocitose: 11; Exocitose: 3; Função mastocitária: 12; House keeping: 65; Metabolismo energético: 9; Proteassoma: 4; Reorganização do citoesqueleto: 26;

Transdução de sinal: 13. Contabilizando um total de 167 proteínas presentes em 8850 µg de proteínas totais analisadas.

Os gráficos, bem como os números absolutos de proteínas identificadas em cada grupo funcional, ao serem analisados e comparados, permitem inferir que o grupo sensibilizado pelo mastoparano concentra grande número de identificações de proteínas relacionadas à função mastocitária, que quando secretada, inclui grande parte das moléculas pró-inflamatórias. Anteriormente à ativação, as proteínas housekeeping eram representadas por 52% de tudo o que era secretado, no entanto, após a ativação as proteínas house keeping somaram apenas 38% do total. Isto indica que a célula mais uma vez, estava comprometida com a maquinaria funcional dos mastócitos. Em números absolutos, a função mastocitária do Endoproteoma Ativado apresentou-se 50% maior que aquela dos mastócitos não ativados, identificando proteínas relacionadas não mais à desgranulação, mas sim à liberação de mediadores recém-sintetizados e neoformados.

Outra categoria que se mostrou acentuada, foi a de reorganização do citoesqueleto, possuindo 15% do total de proteínas do perfil ativado, em contrapartida do não ativado que possui 4% apenas. Estes dados demonstram um redirecionamento da maquinaria celular, muito provavelmente ligada à estruturação do mastócito após a desgranulação, levando a respostas inflamatórias posteriores devido à citotoxicidade do mastoparano.

Os valores apresentados pelo Secretoma Ativado para as categorias de endocitose e exocitose, respectivamente, são de 7% e 2%. Acredita-se que os números encontrados são condizentes com o mecanismo encontrado nas células mastocitárias posteriormente a desgranulação, atuantes na formação e liberação dos fatores recém-sintetizados e mediadores neoformados. Os grânulos correspondentes a exocitose já teriam sido liberados na porção do endoproteoma ativado, dessa forma, justificando a baixa porcentagem encontrada.

5.5 Vias regulatórias que são ativadas pelo peptídeo Protopolybia MP-III em mastócitos

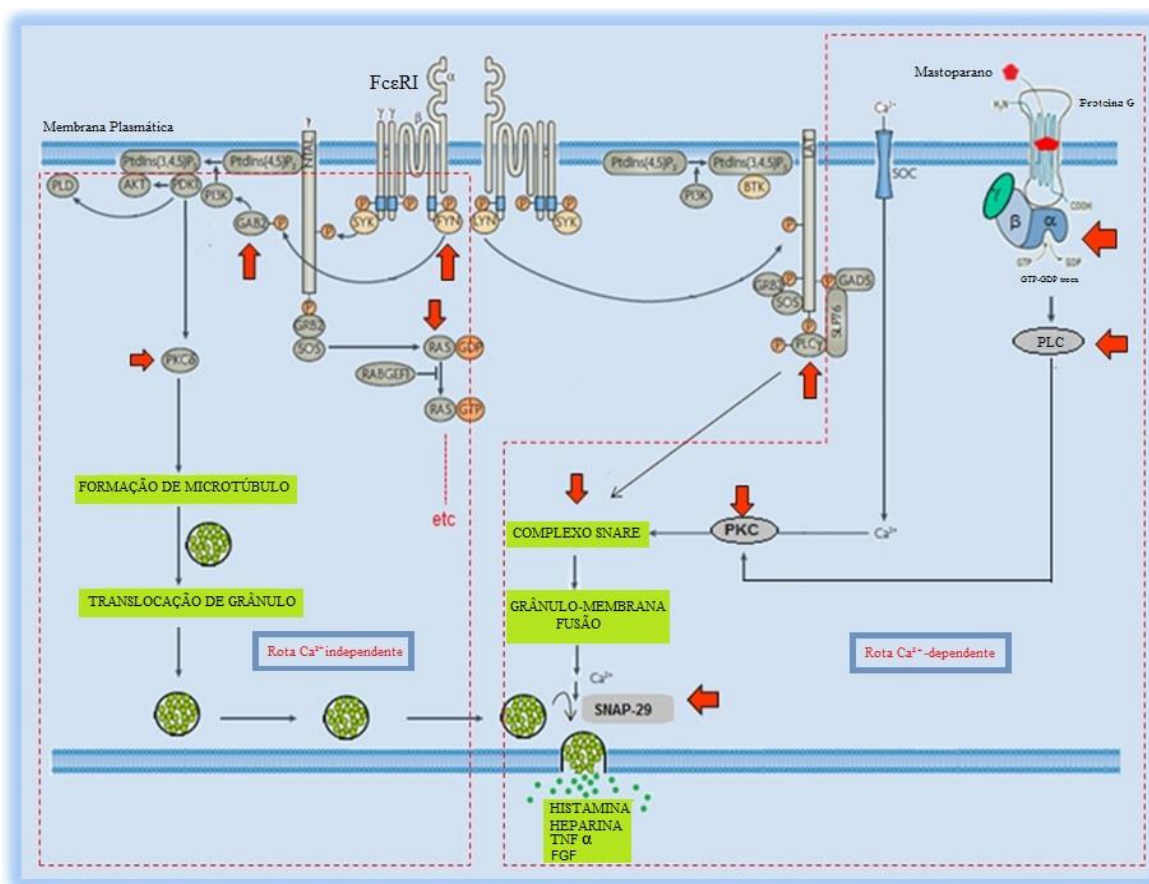
Os venenos de vespas sociais podem conter peptídeos lineares, curtos, policatiônicos, com alto poder da atividade lítica da membrana. Tais como os mastoparanos que provocam a exocitose dos mastócitos (SILVA, 2009, p. 29-31). Os mastócitos são células granuladas que desempenham funções relacionadas ao sistema

imunológico inato, alergias e inflamações. A ativação dos mastócitos induz a fusão dos grânulos com a membrana plasmática, e a liberação de mediadores químicos neoformados e recém-sintetizados. Apesar da existência de uma série de diferentes mecanismos de exocitose, as duas principais vias encontradas nos mastócitos são: (i) ativação dos receptores GPCRs pelos mastócitos, e (ii) ativação da via mediada pelos receptores FcεRI pelos mastócitos, conforme proposto por SANTOS et al., 2012, (p. 2682–2693).

Todavia, ao ser analisada a ação citotóxica do mastoparano Protopolybia MP-III, observou-se a ativação simultânea das duas principais rotas exocíticas, sendo que a rota de ativação de mastócitos por G protein-coupled receptors (GPCRs) interagiu com a rota de ativação mediada pela ligação FcεRI, mesmo na ausência da ligação cruzada com imunoglobulinas E. A ação do mastoparano sobre a via mediada pelos receptores de IgE (FcεRI) ocorreu por efeito intracelular do peptídeo num dos passos metabólicos desta via, não necessitando assim da ligação do anticorpo sobre seu receptor específico (FcεRI), caracterizando o chamado “by pass” desta via.

O outro mecanismo de desgranulação de células mastocitárias causado pelo mastoparano Protopolybia MP-III, inicia-se após a interação com os receptores acoplados à proteína G (GPCRs). A primeira etapa da transdução do sinal é a ativação uma proteína tirosina quinase (PTK) conhecida como Lyn, pertencente à família das Src, constitutivamente associada à subunidade β do receptor inativo de proteína G (SIRAGANIAN, 2003, v. 15, n. 6, 639-946). Posteriormente, ocorre a ativação transitória de Lyn, que por sua vez resulta na ativação e fosforilação da G (GP), da fosfolipase Cγ (PLCγ) e o ligante para a ativação de células T (LAT). A subunidade ativa da proteína G, a Gα-GTP, estimula a fosfolipase C e a fosfoquinase C (PKC). A PLC-β uma vez fosforilada, hidrolisa fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI4,5P2), produzindo inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG). Esses últimos são mensageiros secundários que liberam Ca²⁺ a partir dos reservatórios intracelulares, e ativam a proteína quinase C (PKC) (SIBILANO; FROSSI; PUCILLO, 2014, p. 3-11). Estes eventos resultaram na desgranulação dos fatores pré-formados pelos mastócitos, sendo tal mecanismo esquematizado na figura 3.

Figura 3 - Cascata de sinalização GPCRs



Fonte: Elaborado pelo autor (2014). A subunidade Gα-GTP ativada pelo mastoparano, estimula a phospholipase C (PLC-β) e a fosfoquinase C (PKC). A PLC-β fosforilada hidrolisa fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI4,5P2), produzindo inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). A liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares leva a translocação dos grânulos, e desgranulação dos fatores pré-formados pelos mastócitos. As setas vermelhas indicam as proteínas destas vias, que foram identificadas na análise proteômica. Esquema modificado a partir do modelo original proposto por KRAFT; KINET (2007, p. 366-371).

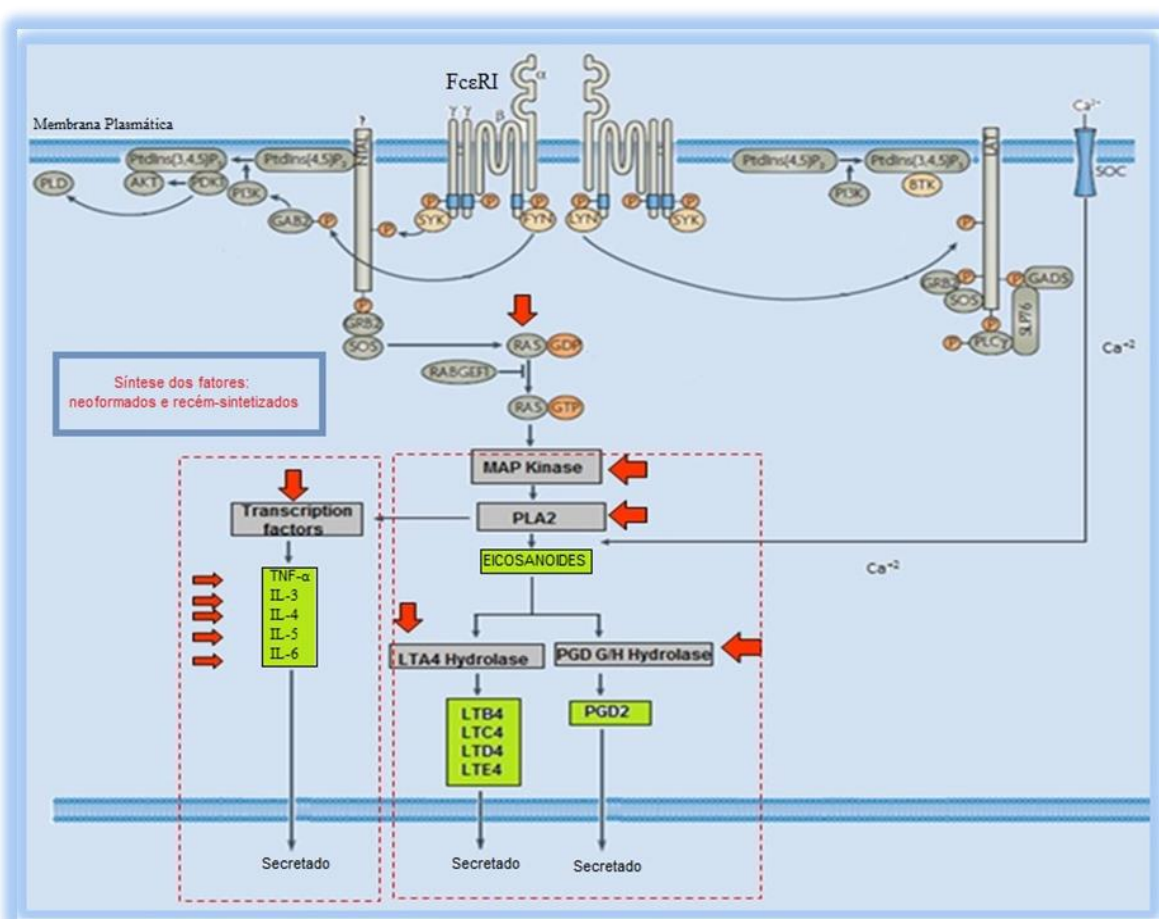
A proteína tirosina quinase Syk, quando ativada, recruta e fosforila a proteína Vav, que por sua vez estimula pequenas GTPases como Rac a ativarem a proteína JNK que resulta na ativação da via da p38 MAP-quinase. As MAP-quinases atuam por meio da fosforilação de fatores de transcrição, proporcionando a produção de citocinas e fatores de crescimento, que serão sintetizados e liberados cerca de 8 a 12 horas após a ativação dos mastócitos e são chamados de fatores recém-sintetizados. Conforme sugere o esquema apresentado pela figura 4 (MARCHINI, 2008, p. 5-7).

Os peptídeos da classe dos mastoparanos favorecem a interação de moléculas com membranas celulares, perturbando a organização dos fosfolipídeos, podendo até promover a desestruturação destas membranas (NAKAJIMA, 1986, p. 309-327). Esses

peptídeos podem ainda interagir com receptores protéicos e canais iônicos presentes nas membranas celulares (MENDES et al., 2004, p. 636–642).

Ao interagirem com os mastócitos, fazem com que o conteúdo dos grânulos seja extravasado, e os fatores neoformados e recém-sintetizados sejam liberados. Assim, originam além da inflamação no local da ferroad, o desencadeamento de uma cascata de eventos, por exemplo, a vasodilatação de capilares, promovendo à quimiotaxia de leucócitos, bem como o recrutamento de células imunitárias, a modulação da contratilidade do músculo liso, a permeabilidade vascular, a sensação de prurido e dor (FREEMAN, 2004, v. 351, p.1978-1984).

Figura 4 - Via de produção dos fatores neoformados e recém-sintetizados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014). Ativação da via sinalizadora da proteína tirosina quinase Fyn e fosforilação das proteínas Gab2 e LAT. Ocorre o estímulo de GTPases como de Ras, ativando a proteína JNK, que resulta na ativação da via da p38 MAP-quinase. A JNK irá fosforilar os fatores de transcrição que induzem a síntese de novas citocinas (fatores neoformados) enquanto a ERK irá ativar a fosfolipase citoplasmática A2 (PLA2) para a liberação do ácido araquidônico (fatores recém-sintetizados). As setas vermelhas indicam as proteínas destas vias, que foram identificadas na análise proteômica. Esquema modificado a partir do modelo original proposto por KRAFT; KINET (2007, p. 366-371).

6 CONCLUSÃO

Nos venenos de vespas sociais, um dos componentes biologicamente ativos de maior importância dentre os peptídeos, são os desgranuladores de mastócitos, conhecidos como mastoparanos. Este trabalho investigou alguns dos processos de ativação celular causados pelo peptídeo mastoparano Protopolybia MP-III encontrado na vespa neotropical *Polybia exigua exigua*. O desenvolvimento deste projeto foi realizado através de uma abordagem proteômica *shotgun*, sendo as proteínas analisadas por espectrometria de massas com a utilização de um sistema ESI-LCMS-IT-ToF. A estratégia utilizada permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos de ação do mastoparano Protopolybia MP-III, bem como, para o entendimento dos processos inflamatórios causados pela toxina.

As proteínas identificadas permitiram inferir que a intensa atividade exocitótica é oriunda da ativação da subunidade α da proteína G pertencente ao complexo GPCR. A subunidade ativa $G\alpha$ -GTP, estimula a phospholipase C e a fosfoquinase C (PKC). A ativação da via sinalizadora da proteína tirosina quinase Fyn e fosforilação de tirosinas da proteína Gab2 e LAT. Ocorre o estímulo de GTPases como Rac a ativarem a proteína JNK que resulta na ativação da via da p38 MAP-quinase. A JNK irá fosforilar os fatores de transcrição que induzem a síntese de novas citocinas (fatores neoformados) enquanto a ERK irá ativar a fosfolipase citoplasmática A2 (PLA2) para a liberação do ácido araquidônico (fatores recém-sintetizados).

Por esta razão, pode-se concluir que as interações moleculares discutidas anteriormente resultam no aumento do efeito inflamatório causado pela ação da toxina mastoparana.

As identificações de 622 proteínas relacionadas ao metabolismo mastocitário e a comparação entre as amostras não ativadas e ativadas evidenciaram que o peptídeo Protopolybia MP-III pode estar envolvido com:

I) Interação com a subunidade α da proteína G pertencente ao complexo GPCR e liberação do conteúdo dos grânulos pré-formados como: β -hexosaminidase, proteoglicanas, proteases neutras e algumas citocinas que participam da imunidade, as interleucinas IL-8 e IL-16 e alguns fatores como o TNF- α (Tumor Necrosis Factor), b-FGF (Fibroblast Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), SCF (Stem Cell Factor);

II) Integralização das duas principais rotas de exocitose, sendo que a rota de ativação de mastócitos por GPCRs interagiu *by passing* com a rota de ativação mediada pela ligação FcεRI, estando na ausência de moléculas de imunoglobulinas E;

III) Ativação de duas rotas metabólicas: uma independente de Ca^{2+} relacionada à proteína tirosina quinase Fyn e outra dependente de Ca^{2+} relacionada às proteínas LAT e Lyn. O estímulo dessas duas rotas resultou na síntese e liberação dos fatores neoformados como a PGD₂ (prostaglandina D₂), leucotrienos LTC₄ e LTB₄, PAF (Platelet Activating Factor) e a síntese e liberação dos fatores recém-sintetizados como as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6 e o fator estimulador de colônias granulócitos.

Por conseguinte, os resultados demonstraram a pertinência do estudo dos produtos naturais oriundos de venenos animais, uma vez que os mastoparanos foram obtidos dos venenos das vespas sociais, mostrando a riqueza e a multiplicidade desses compostos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LINCHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2013, p.3-51.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1133, 2004.
- ANTONICELLI, L.; BILO, M. B.; BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera Allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, London, v.2, p. 341-346, 2002.
- ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulation peptides from wasp venom. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 258, n. 22, p. 13697-13702, 1983.
- AKDIS, M.; BURGLER, S.; CRAMERI, R.; EIWEGGER, T.; FUJITA, H.; GOMEZ, E.; KLUNKER, S.; MEYER, N.; O'MAHONY, L.; PALOMARES, O.; RHYNER, C.; QUAKED, N.; SCHAFFARTZIK, A.; VEEN, W.; ZELLER, S.; ZIMMERMANN, M.; CEZMI, A. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Denver, v.127, n.3, p. 701-721, 2011.
- BAKER, S. J.; REDDY, E. P. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. **Oncogene**, Philadelphia, v.17, n. 12, p. 1-9, 1996.
- BAPTISTA, N. B.; SAIDEMBERG, D. M.; SOUZA, B. M.; CÉSARTOGLI, L. M. M.; FERREIRA, V. M. R.; MENDES, M. A.; CABRERA, M. P. S.; RUGGIERO NETO, J.; PALMA, M. S. Protonectin (1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, Elmsford, v. 56, n. 6, p.880-889, 2010.
- BASTOLLA, F. M. **Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em Eucalyptus**. 2007.112f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- BROCHETTO-BRAGA, M. M. Recombinant allergens for diagnosis and immunotherapy for allergy to venom of social hymenoptera. In: INTERNATIONAL SYMPOSIA ON ENTOMOLOGY, n.4, 2013, Orlando. **Anais...** Westlake: Entomology, Ornithology & Herpetology: Current Research, 2013, p.2.
- CARPENTER, T.; BOND, P. J.; KHALID, S.; SANSOM, M.S. P. Self-assembly of a simple membrane protein: coarse-grained molecular dynamics simulations of the influenza M2 channel. **Biophys Journal**, Oxford, v.1, p.3-10, 2008.
- CARNINCI, P. The transcriptional landscape of the mammalian genome. **Science**, Washington, v. 311, n. 5768, p. 1559-1563, 2005.

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

CASTRO, F. F. M. **Reações alérgicas por venenos de Hymenoptera**: experiência de 20 anos. Tese (Livre Docência - Disciplina de Alergia e Imunopatologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, p.132, 2001.

CHAO, S.; CHAI, K.X.; CHAO, L.; CHAO, J. Molecular cloning and primary structure of rat alpha 1-antitrypsin. **Biochemistry**, Nashville, v. 29, n. 2, p. 323-329, 1990.

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

CHEN, J. S.; EXTON, J. H. Regulation of phospholipase D2 activity by protein kinase C alpha. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 279, n. 21, p. 22076-22083, 2004.

CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. **The EMBO Journal**, Haifa, v. 17, n. 24, p. 7151-7160, 1998.

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.

CRIVELLATO, E.; BELTRAMI, C. A.; MALLARDI, F.; RIBATTI, D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander?. **Histology and Histopathology**, Udine, v.19, n. 1, p. 259-270, 2004.

CUNTO, F.; CALAUTTI, E.; HSIAO, J.; ONG, L.; TOPLEY, G.; TURCO, E.; DOTTO, P. Citron rho-interacting kinase, a novel tissue-specific ser/thr kinase encompassing the Rho-Rac-binding protein Citron. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 273, n.45, p.29706-29711, 1998.

DENNIS, E. A. Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A2. **The Journal of Biological Chemist**, Rockville, v. 269, n. 18, p.13057-13060,1994.
DUFFY, S.L.; COULTHARD, M.G.; SPANEVELLO, M.D.; HERATH, N.I.; YEADON, T.M.; MCCARRON, J.K.; CARTER, J.C.; TONKS, I.D.; PHILLIPS, G.E.; BOYD, A.W. Generation and characterization of EphA1 receptor tyrosine kinase reporter knockout mice. **Genesis**, New York, v.46, n.10, p.553-561, 2008.

DVORAK, A. M. Ultrastructural studies of human basophils and mast cells. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Boston, v. 53, n. 9, p. 1043-1070, 2005.
ELLIOTT, W. H.; ELLIOTT, D. C. **Biochemistry and Molecular Biology**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2001, p.109.

ELLIS, M.V.; JAMES, S.R.; PERISIC, O.; DOWNES, C.P.; WILLIAMS, R.L.; KATAN, M. Catalytic domain of phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC). Mutational analysis of residues within the active site and hydrophobic ridge of

plcdelta1. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 273, n.19, p. 11650-11659, 1998.

EVANS, H. E.; EBERHARD, M. J. W. **The Wasps**, Ann Arbor: University of Michigan Press, 1970, p.265.

FRANSEN, L.; MÜLLER, R.; MARMENOUT, A.; TAVERNIER, J.; HEYDEN, J.; KAWASHIMA, E.; CHOLLET, A.; TIZARD, R.; HEUVERSWYN, H.; VLIET, A. Molecular cloning of mouse tumour necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 4417-4429, 1985.

FILHO, G.B. **Patologia Geral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Bogliolo, 2004, p.367.
FIMMEL, C.J.; BROWN, K.E.; O'NEILL, R.; KLADNEY, R.D. Complement C4 protein expression by rat hepatic stellate cells. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 157, n. 6, p. 2601-2609, 1996.

FLOREA, L.; FRANCESCO, V.; MILLER, J.; TURNER, R.; YAO, A.; HARRIS, M.; WALENZ, B.; MOBARRY, C.; MERKULOV, G.V.; CHARLAB, R.; DEW, I.; DENG, Z.; ISTRAIL, S.; Li, P.; SUTTON, G. Gene and alternative splicing annotation with AIR. **Genome Research**, New York, v. 15, n.1, p. 54-66, 2005.

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

GARDELL, S.J.; CRAIK, C.S.; CLAUSER, E.; STEWART C, B.; GRAF, M.; RUTTER, W.J. A novel rat carboxypeptidase, CPA2: characterization, molecular cloning, and evolutionary implications on substrate specificity in the carboxypeptidase gene family. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.263, n. 33, p. 17828-17836, 1988.

GIMENEZ, M.; MARIE, S. K. N.; OBA, S.; SUELI, M.; UNO, M.; SILVA, R.; LAURE, H.; IZUMI, C.; OTAKE, A.; CHAMMAS, R.; ROSA, J. C. Quantitative proteomic analysis and functional studies reveal that nucleophosmin is involved in cell death in glioblastoma cell line transfected with siRNA. **PROTEOMICS**, Weinheim, v. 12, n. 17, p. 2632-2640, 2012.

GREEN, P.J.; WALSH, F.S.; DOHERTY, P. Promiscuity of fibroblast growth factor receptors. **Bioessays**, Iowa city, v.18, n. 8, p. 639-646, 1996.

HIGASHIJIMA, T.; UZU, S.; NAKAJIMA, T.; ROSS, E. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.263, n.14, p.6491-6494, 1988.

HIRAI, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; FUJINO, M.; KITADA, C. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 8, p. 1942-1944, 1979.

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

ISHIDA, T.; MIZUSHIMA, S.; AZUMA, S.; KOBAYASHI, N.; TOJO, T.; SUZUKI, K.; AIZAWA, S.; WATANABE, T.; MOSIALOS, G.; KIEFF, E.; YAMAMOTO, T.; INOUE, J. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 271, n.56, p. 28745-28748, 1996.

JACOMINI, D. L. J.; PEREIRA, F. D. C.; PINTO, J.R.A.S.; SANTOS, L.D.; NETO, A. J. S.; GIRATTO, D. T.; PALMA, M. S.; ZOLLNER, R. L.; BROCHETTO-BRAGA, M. M. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, Elmsford, v.64. p. 70-80, 2013.

JACOMINI, D. L. J.; MOREIRA, G. S. M.; PEREIRA, F. D.; ZOLLNER, R. L.; BROCHETTO-BRAGA, M. M. Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom. **Toxicon**, Elmsford, v.82. p.104-111, 2014.

JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C.; MORENO, A. N.; MELLO Lde F.; PASTOR, M. V.; BERENSTEIN, E. H.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER, C. Identification and isolation of rat bone marrow derived mast cells using the mast cell-specific monoclonal antibody AA4. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Ribeirão Preto, v. 48, n.2, p. 219-228, 2001.

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

JORDA, M.A.; VERBAKEL, S.E.; VALK, P.J.; VANKAN, B.Y.V.; MACCARRONE, M.; FINAZZI, A.A.; LÖWENBERG, B.; DELWEL, R. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. **Blood Journal**, Washington, v.99, n.8, p. 2786-2793, 2002.

KAMACHI, Y.; KONDOH, H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. **Development**, Cambridge, v. 140, n. 20, p. 4129-4144, 2013.

KILE, B.T.; SCHULMAN, B.A.; ALEXANDER, W.S.; NICOLA, N.A.; MARTIN, H.M.; HILTON, D.J. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 27, n.5, p. 235-241, 2002.

KIRSHENBAUM, A. Regulation of mast cell number and function. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 14, p. 497-516, 2000.

KRAFT, S.; KINET, J. P. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. **Nature Publishing Group**, Boston, v.12, p. 366-371, 2007.

KRISHNASWAMY, G.; AJITAWI, O.; CHI, D. S. The human mast cell: an overview. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 315, n. 1, p. 13-34, 2006.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. **NIH Public Access**, Rockville Pike, v. 141, n. 7, p. 1117-1134, 2011.

LIEBLER, D. C. The Proteome. In: Liebler, D. C. **Introduction to proteomics: tools for the new biology**. Totowa: Ed.Human Press, 2002, p. 1-13.

LOPES, L. **Vespas sociais no Rio de Janeiro**. Cordeiro, 2013. Apresenta imagem sobre o ninho de *Protopolybia exigua exigua*. Disponível em: <http://www.insetologia.com.br/2013_01_06_archive.html>. Acesso em 11 ago.2014.

LU, Y.; WANG, B.; HUANG, H.; DONG, J.; LU, M.; YANG, D. Molecular characterization of Marmota himalayana interferon alpha. **Developmental and comparative immunology**, London, v. 32, n.4, p. 445-457, 2008.

MA, S.; LIU, M.A.; YUAN, Y.L.; ERIKSON, R.L. The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 phase polo-like kinase that is inhibited by the calcium- and integrin-binding protein CIB. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v.1, n. 5, p.376-384, 2003.

MALUF, L. C.; BARROS, J. A.; FILHO, A. S. M. Mastocitose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Santo André, v.84, n. 3, p. 213-225, 2009.

MARCHINI, C. M. M. **O papel funcional da enzima fosfolipase D2 (PLD2) nas células da linhagem de mastócitos RBL-2H3**. 2008. 84f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, New Jersey, v. 18, p. 636-642, 2004.

MENEGASSO, A. R. S. **Desenvolvimento da técnica de MALDI Imaging utilizando tecidos animais**. 2010. 98f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

MENEGASSO, A. R. S. **Uma abordagem peptidômica do veneno do escorpião *Tityus serrulatus***. 2012. 128f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

MIYAKE, Z.; TAKEKAWA, M.; GE, Q.; SAITO, H. Activation of mtk1/meck4 by gadd45 through induced n-c dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the mtk1 kinase domain. **Molecular and Cellular Biology**, Iowa city, v. 27, n. 7, p. 2765-2776, 2007.

MOURA, P.R.; VIDAL, F.A.P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 21, n. 1, p.31-36, 2011.

MORIGUCHI, T.; TOYOSHIMA, F.; MASUYAMA, N.; HANAFUSA, H.; GOTOH, Y.; NISHIDA, E. A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF α and cellular stresses. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 16, n. 23, p. 7045-7053, 1997.

NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: PIEK, T. **Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, pharmacological and behavioural aspects**. London: Academic Press Inc. Ltd, p. 309-327, 1986.

NETO, E. M. C. Análise etnossemântica de nomes comuns de abelhas e vespas (insecta, hymenoptera) na terra indígena pankararé, Bahia, Brasil. **Cadernos de Linguagem e Sociedade**, Feira de Santana, v.1, n. 14, p. 237-251, 2013.

NEWMAN, J.W.; MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B.D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, Iowa city, v. 44, n.1, p. 1-51, 2005.

NITTNER, M. 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. **Medical Science Monitor**, Philadelphia, v.10, n.7, p. 324-329, 2004.

PALMA, M. F. M.; GOBBI, N. Sting Autotomy, Sting Morphology and Sociality in Neotropical Vespids (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Hymenoptera Research**, Rio Claro, v.6, p.152-162, 1997.

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

PAWSON, T.; NASH, P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. **Genes & Development**, New York , v.14, p.1027-1047, 2000.

PEREIRA S, M. C.; PEDRO, E.; SPINHOLA S. A.; BRANCO, F. M.; PALMA, C. M. L.; PALMA, C. A.G. Immunoblot studies in allergic patients to hymenoptera venom before and during immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Paris, v.37, n.7, p.273-278, 2005.

PINTO, J. R. A. S. **Caracterização do antígeno-5, alérgeno da vespa social *Polybia paulista* com uma abordagem proteômica**. 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

PINTO, J. R. S.; FOX, E. G. P.; SAIDEMBERG, D. M.; SANTOS, L. D.; MENEGASSO, A. R. S. MANSO, E. C.; MACHADO, E. A.; BUENO, O. C.; PALMA, M. S. Proteomic View of the Venom from the Fire Ant *Solenopsis invicta* Buren. **Journal of Proteome Research**, Washington, v.11, n. 9, p. 4643-4653, 2012.

PISANO, J. J. Kinins in Nature. **Handbook of Experimental Pharmacology**, New York, Springer, v. 25, p. 273-285, 1979.

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

RECH, R. R.; GRAÇA, D.L. Mastócitos em condições normais e patológicas. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n.1, p. 50-61, 2006.

REISMAN, R. E.; LIVINGSTON, A. Late-onset allergic reactions, including serum sickness, after insect stings. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v.84, p.331-337, 1989.

ROCHA, A. A.; GIONNOTTI, E.; Foraging Activity of *Protopolybia exigua* (Hymenoptera, Vespidae) in Different Phases of the Colony Cycle, at an Area in the Region of the Médio São Francisco River, Bahia, Brazil. **Sociobiology**, Rio Claro, v.50, n. 3, p. 813-833, 2007.

ROCHA, T. **Ação do mastoparano Polybia MP-II nas fibras musculares e na junção neuromuscular**: Um estudo morfológico, imunohistoquímico e biofísico. 2008. 125f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

ROCHA, T.; BARROS, L. L.; FONTANA, K.; SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; CRUZ, M. A. H.; Inflammation and apoptosis induced by mastoparan Polybia-MPII on skeletal muscle. **Toxicon**, Campinas, v. 55, n. 7, p. 1213-1221, 2010.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **NIH Public Access**, Rockville Pike, v. 31, n.5, p.986-1000, 2011.

SAIDEMBERG, D. M. **Bioprospecção e caracterização químico-funcional de compostos orgânicos de baixas massas moleculares de venenos das vespas sociais: *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* e *Polybia paulista* (Hymenoptera - Vespidae)**. 2009. 127f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SAIDEMBERG, N. B. B. **Análise peptidômica dos venenos de vespas sociais neotropicais**. 2011. 138f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

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

SANTOS, L. D.; PIERONI, M.; MENEGASSO, A. R. S.; PINTO, J. R. A. S.; PALMA, M. S. A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Rio Claro, v.17, p. 364-377, 2011.

SANTOS, L. D.; PINTO, J. R. A. S.; MENEGASSO, A. R. S.; SAIDEMBERG, D. M.; GARCIA, A. M. C.; PALMA, M. S. Proteomic profiling of the molecular targets of interactions of the mastoparan peptide *Protopolybia* MP-III at the level of endosomal membranes from rat mast cells. **Proteomics**, Weinheim v.12, n.17, p. 2682-2693, 2012.

SÃO PAULO SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO. **Ataques de abelhas levam seis por dia ao hospital**. São Paulo, 2012. Apresenta gráfico sobre os ataques.

Disponível em:

< <http://www.saude.sp.gov.br/ses/noticias/2012/agosto/ataques-de-abelhas-levam-seis-por-dia-ao-hospital-em-sp>>. Acesso em 11 ago.2014.

SE,N.R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell Press**, Maryland Heights, v. 46, n.5, p.705-716, 1986.

SEIDLER, J.; ZINN, N.; BOEHM, M. E.; LEHMANN, W. D. De novo Sequencing of Peptides by MS/MS. **Proteomics**, Weinheim , v. 10, n. 4, p. 634-649, 2010.

SIBILANO, R.; FROSSI, B.; PUCILLO, C. E. Mast cell activation: A complex interplay of positive and negative signaling pathways. **European Journal of Immunology**, Udine, v. 44, n. 7, p. 3-11, 2014.

SCUDIERO,I.; ZOTTI, T.; FERRAVANTE, A.; VESSICHELLI, M.;REALE, C.; MASONE, M.C.; LEONARDI, A.; VITO, P.; STILO, R. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 7 is required for TNF α -induced Jun NH2-terminal kinase activation and promotes cell death by regulating polyubiquitination and lysosomal degradation of c-FLIP protein. **The Journal of Biological Chemist**, Rockville, v. 287, n. 8, p. 6053-6061, 2012.

SMITH, D.S.; NIETHAMMER, M.; AYALA, R.; ZHOU, Y.; GAMBELLO, M.J.; WYNshaw, A.; TSAI, L.H. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. **Nature Cell Biology**, London, v. 2, n. 11, p. 767-775, 2000.

SIRAGANIAN, R. P. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. **Current Opinion in Immunology**, Bethesda, v. 15, n. 6, 639-946, 2003.

SILVA, A. V. R. **Prospecção das interacoes mastoparanomembrana em proteolipossomos como modelo para o desenvolvimento racional de novos agentes antimicrobianos**. 2009. 129f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SOUZA, B. M.; SILVA, A. V.; RESENDE, V. M.; ARCURI, H. A.; SANTOS C, M. P.; NETO, J. R.; PALMA, M. S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, New York, v. 30, n. 8, p. 1387-1395, 2009.

STEEN, C. J.; JANNIGER, C. K.; SCHUTZER, S. E.; SCHWARTZ, R. A. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. **International Journal of Demartology**, Philadelphia, v. 44, n. 2, p. 91-94, 2005.

STOCKLIN, R.; FAVREAU, P. Proteomics of Venom Peptides. In: MÉNEZ, A. **Perspectives in Molecular Toxinology**.Chichester: England John Wiley and Sons, Ltd, 2002, p. 107-123.

SWEET,M.J.; HUME, D.A. CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*,Warsz, v.51, n. 3, p. 169-177, 2004.

TEWARI, M.; MOHN, K.L.; YUE, F.E.; TAUB, R.A. Sequence of rat RL/IF-1 encoding an IkappaB, and comparison with related proteins containing Notch-like repeats. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 603, 1992.

THE IRON lady. Direção: Phyllida Lloyd. Produção: Damian Jones. Reino Unido: Weinstein Company, 2011, 1DVD.

TSENG, P.H.; MATSUZAWA, A.; ZHANG, W.; MINO, T.; , VIGNALI, D.A.;KARIN, M. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. **Nature Immunology**, Boston, v. 11, n.1, p. 70-75, 2010.

VETTER, R.S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International Journal of Demartology**, Philadelphia, v.37, p. 481-496, 1998.

WADA, M.; NAKANISHI, H.; SATOH, A.; HIRANO, H.; OBAISHI, H.; MATSUURA, Y.; TAKAI, Y. Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins, **The Journal of Biological Chemist**, Rockville, v. 272, n. 7, p. 3875-3878,1997.

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**, Philadelphia, v. 21, n. 15, p. 1580-1590, 2003.

WENZEL, J. W. Evolution of Nest Architecture. In: Ross, K. G. & R. W. Matthews. **The Social Biology of Wasps**. London: Comstock Publishing Associates, p. 677, 1991.
WINNINGHAM, K. M.; FITCH, C. D.; SCHMIDT, M.; HOFFMAN, D. R. Hymenoptera Venom Protease Allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v.114, p.928-933, 2004.

WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, San Diego, v. 73, n. 23, p. 5683-5690, 2001.

WU, C. C.; COSS, M. J. M. Shotgun proteomics: Tools for the analysis of complex biological systems. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, San Diego, v. 4, n. 3, p. 242-250, 2002.

WU, C.; AGRAWAL,S.; VASANJI, A.; DRAZBA, J.; SARKARIA, S.; XIE, J.; WELCH, C.M.;LIU, M.; ANAND,A. B.; HOROWITZ, A. Rab13-dependent trafficking of RhoA is required for directional migration and angiogenesis. **The Journal of Biological Chemist**, Rockville, v.286, n. 26, p. 23511-23520, 2011.

APÊNDICE A – IMUNOGLOBULINAS IDENTIFICADAS

- Endoproteoma de mastócitos NÃO ativados

TABELA 5 - Identificações das Imunoglobulinas obtidas do Endoproteoma de mastócitos NÃO ativados.

Código de acesso	Identificação	% de Cobertura	MS/MS Peptide Sequence (Ion Score)	MASCOT score	Organismo
IMUNOGLOBULINAS					
P20760	Gamma-2a immunoglobulin heavy chain	5	FTISR (10) SVSELPVHR (23) VNSGAFPAPIEK (11)	44	<i>Rattus norvegicus</i>
AAH88240	IgG-2a protein	16	VTCVVVDISQNDPEVR (51) SVSELPVHR (25) VNSGAFPAPIEK (11)	87	<i>Rattus norvegicus</i>
AAM22075	Minor histocompatibility antigen H13 isoform 1	3	GKSSSDMPETISR (17)	17	<i>Mus musculus</i>
AAC04548	Monoclonal antibody heavy chain	12	YTMSWVRQISAK (15) FTISR (10)	35	<i>Mus musculus</i>
NP_032671	Murinoglobulin-1 precursor	1	GPTHEFSK (13) LVDIK (32) NLQPAIVK (8)	53	<i>Mus musculus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

- **Endoproteoma de mastócitos ATIVADOS**

TABELA 6 - Identificações das Imunoglobulinas obtidas do Endoproteoma de mastócitos ATIVADOS.

Código de acesso	Identificação	% de Cobertura	MS/MS Peptide Sequence (Ion Score)	MASCOT score	Organismo
IMUNOGLOBULINAS					
P20761	Ig gamma-2B chain C region	8	DILLISQNAK (28) ALPSPIEK (10) TISK (3) LNVER (20)	61	<i>Rattus norvegicus</i>
P01754	Immunoglobulin heavy chain variable region	8	QNPGAELVK (25)	25	<i>Mus musculus</i>
O19461	MHC class II I-A-beta protein precursor	5	GQTILK (31)	31	<i>Mus musculus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

- **Secretoma NÃO ativado**

TABELA 7 - Identificações das Imunoglobulinas obtidas do Secretoma NÃO ativado.

Código de acesso	Identificação	% de Cobertura	MS/MS Peptide Sequence (Ion Score)	MASCOT score	Organismo
IMUNOGLOBULINAS					
P08649	Complement C4	1	NPSEPVPQAPALWIETTAYGLLHLLR (19)	19	<i>Rattus norvegicus</i>
P01754	Ig heavy chain	20	QRPGRGLEWIGRIDPNGGGTRYNEK (22)	22	<i>Mus musculus</i>
P01835	Ig kappa chain C region	41	DGVLDVTDQDSK (42) ADYESHNLTYCEVVHK (8)	86	<i>Mus musculus</i>

AAH88240	IgG-2a protein	5	SISR (23)	28	<i>Rattus norvegicus</i>
			VNSGAFPAPIEKSISKPEGTPR (5)		
AAH52892	Immunoglobulin superfamily, member 3	1	LSISR (23)	12	<i>Mus musculus</i>
			NYNNTWTR (12)		
NP_075591	Murinoglobulin 1 precursor	2	NLHPLNELFPLAYIEDPK (12)	55	<i>Rattus norvegicus</i>
			AFIFIDESHITDAFTWLSK (43)		

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

• Secretoma de mastócitos ATIVADOS

TABELA 8 - Identificações das Imunoglobulinas obtidas do Secretoma de mastócitos ATIVADOS.

Código de acesso	Identificação	% de Cobertura	MS/MS Peptide Sequence (Ion Score)	MASCOT score	Organismo
IMUNOGLOBULINAS					
P01835	Ig kappa chain C region, B allele	16	DISVK (9)	29	<i>Rattus norvegicus</i>
			DGVLDsvTDQDSK (29)		
P01754	Immunoglobulin heavy chain variable region	8	QNPGAELVK (26)	26	<i>Mus musculus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Prof. Dr. Mario Sergio Palma
(Orientador)

Msc. Anally Ribeiro da Silva Menegasso
(Co-orientadora)

Ana Maria Caviquioli Garcia
(Graduanda)