



## Análise proteômica das principais proteínas antigênicas do veneno da vespa *Agelaia pallipes*\*

*Proteomic analysis of mayor antigenic proteins from Agelaia pallipes venom*

Clóvis E. S. Galvão<sup>1,2,3,5</sup>, Leo K. Iwai<sup>2,5</sup>, Lucilene D. Santos<sup>3,4,5</sup>,  
Maria Anita Mendes<sup>3,4,5</sup>, Mario S. Palma<sup>3,4,5</sup>, Fabio F. M. Castro<sup>1,3,5</sup>,  
Edécio Cunha Neto<sup>1,2,5</sup>, Jorge Kalil<sup>1,2,3,5</sup>.

### Resumo

**Objetivo:** alguns pacientes alérgicos ao veneno de vespas apresentam pesquisa negativa de IgE específica com os extratos disponíveis. Para investigar esta falta de reação cruzada, este estudo pretende caracterizar os antígenos principais do veneno de uma das espécies encontradas no Brasil, a *Agelaia pallipes*, utilizando a análise proteômica.

**Método:** realizamos eletroforese bidimensional com veneno de *Agelaia pallipes*. Na primeira dimensão utilizamos tiras de gel de 7 cm com gradiente de pH de 3.0 -10.0, e na segunda SDS-PAGE 15%. Com os géis feitos em duplicata, o primeiro foi transferido para nitrocelulose e incubado com o soro de paciente sensibilizado (diluição 1:5). A imunodeteção foi realizada com anti-IgE humana biotinizada e ECL (Enhanced Chemiluminescence). No segundo gel, corado com *Coomassie*, os spots correspondentes às proteínas reconhecidas pela IgE através do *immunoblotting* foram processados e analisados no espectrometro de massa do tipo MALDI-ToF. A identificação foi obtida por PMF - *Peptide Mass Fingerprinting*.

**Resultados:** a eletroforese bidimensional com o veneno da *Agelaia pallipes* evidenciou várias proteínas com peso molecular (PM) abaixo de 20kDa. Com *immunoblotting* foram detectadas proteínas reconhecidas pela IgE com PM entre 20 e 38 kDa. Pela análise proteômica, estas proteínas foram identificadas principalmente como antígeno 5 e serino-proteases.

**Conclusão:** este é o primeiro trabalho a identificar alérgenos de vespas neotropicais com análise proteômica. Além do antígeno 5, identificamos serino-proteases que apenas recentemente foram citadas neste tipo de amostra biológica, mostrando semelhança parcial entre estas e proteínas de venenos de vertebrados (serpentes). Nosso projeto futuro será o seqüenciamento das amostras.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(1):20-25 Hymenopteros, vespa, Eletroforese bidimensional, Imuno-blotting, proteoma.

### Abstract

**Objectives:** Some patients allergic to vespid venoms have negative specific IgE tests when using the available extracts. To assess this lack of cross-reactivity, this study intends to determine the major allergenic proteins of *Agelaia pallipes* venom (one of the species found in Brazil) using the proteomic analysis.

**Methods:** *Agelaia pallipes* venom (50 glands) was submitted to bidimensional electrophoresis using immobilized pH gradient strips (3.0 -10.0) for the first dimension and 15% PAGE gel for the second dimension. Gels were made in duplicate. One of them transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with the serum from a sensitized patient diluted 1:5. Immunoblot detection was performed with biotinylated human anti-IgE and ECL (Enhanced chemiluminescence). On the other gel, after *Coomassie* Blue staining, the spots corresponding to the proteins recognized by specific IgE in the immunoblotting were processed and analyzed using a MALDI-ToF mass spectrometer. Identification was obtained by Peptide Mass Fingerprinting (PMF).

**Results:** the bidimensional electrophoresis with the venom showed many proteins with molecular weight (MW) lower than 20 kDa. Proteins recognized by specific IgE with immunoblotting essays had MW between 20 - 38 kDa. Those proteins were identified as Antigen 5 and serine-proteases.

**Conclusion:** This is the first study to identify neotropical venom allergens using proteomic analysis. Allergens were identified as Antigen 5 and serine-proteases that were recently reported on this kind of biologic samples. These proteases also presented with partial similarity with those from vertebrates (snakes). The next step of our study will be the sequencing of these proteins.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(1):20-25 Hymenoptera, vespids, 2-dimensional, immunolabelling, proteomics.

1. Divisão de Imunologia Clínica e Alergia - Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
2. Laboratório de Fotobiologia, Histocompatibilidade e Imunidade celular (LIM19) - Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
3. Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LIM60) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
4. Departamento de Biologia e Instituto de Biociências - Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP de Rio Claro.
5. Instituto de Investigação em Imunologia - Instituto do Milênio - CNPq/MCT.

\* Trabalho agraciado com o prêmio Oswaldo Seabra no 31º Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia.

## Introdução

O diagnóstico das reações alérgicas a veneno de *Hymenoptera* (abelha, vespa, formiga) é feito baseado na história clínica e pesquisa de IgE específica *in vivo*, pelos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata; ou *in vitro*, pela determinação sérica de IgE específica<sup>1</sup>, entretanto, em certas situações, os testes cutâneos e a determinação *in vitro* da IgE específica apresentam um valor preditivo limitado, mesmo quando o paciente possui história de reação sistêmica, pois os extratos comercialmente disponíveis para a realização dos testes, são provenientes de outros países e em muitas ocasiões como é o caso das vespas, diferem das espécies encontradas aqui no Brasil. Este fato tem importante repercussão no diagnóstico e tratamento dos indivíduos vítimas de ferroadas, uma vez que a imunoterapia para veneno de Hymenoptera dirigida pela pesquisa de IgE específica tem mostrado eficácia de até 90 a 100%, de acordo com análises sistemáticas da literatura sobre o assunto<sup>2</sup>.

Em um dos poucos estudos realizados no Brasil, Castro et al<sup>3</sup> compararam os constituintes do veneno de abelha africanizada (*Apis mellifera*) e da vespa *Polistes versicolor*, mostrando baixa reatividade cruzada entre os venenos destas espécies, e chamando atenção para a alta incidência de resultados falso-negativos durante determinações de IgE específica para *Polistes versicolor* quando utilizou-se extratos com venenos de vespas de climas temperados (Europa e EUA).

Mais recentemente, Esher et al<sup>4</sup> avaliaram 138 pacientes com história de reação a abelha, vespa e formiga no Brasil, e relataram que os métodos de determinação para IgE específica *in vitro*, sobretudo o RAST apresentam baixa sensibilidade e especificidade em nosso meio, principalmente para vespa, provavelmente devido à grande diversidade de espécies presentes no Brasil, diferentes daquelas utilizadas para a obtenção dos extratos usados para diagnóstico e tratamento, provenientes da Europa e Estados Unidos. Neste trabalho, o isolamento das vespas causadoras dos acidentes e a obtenção de extratos provenientes das espécies locais aumentaram significativamente a positividade do teste cutâneo, permitindo um diagnóstico mais preciso.

O presente trabalho teve como objetivo identificar as proteínas reconhecidas por IgE do veneno através de *immunoblotting*, utilizando soro de pacientes sensibilizados; caracterizar os antígenos imunodominantes do veneno da vespa *Agelaia pallipes*, utilizando a análise proteômica, por espectrometria de massa e seqüenciamento peptídico.

## Material e Métodos

### Obtenção do soro

Foram coletadas, por venopunção, amostras de sangue de paciente com história de reação sistêmica após ferroadada de vespa identificada como *Agelaia pallipes*, antes do início de tratamento específico. O paciente, masculino, 59 anos, natural e procedente de Itapagipe (MG), informa que há quatro anos, sofreu uma ferroadada de vespa em face. Logo em seguida apresentou mal-estar geral, náuseas e desmaio, melhorou espontaneamente três horas depois (SIC). Após este episódio foi ferroadado pelo menos mais três vezes pela mesma vespa com quadro muito semelhante ao já descrito, queixando-se ainda de falta de ar, sem lesões cutâneas. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, durante dez minutos, para separação do soro que foi alíquotado em tubos "Eppendorf" e estocado em freezer a -20°C, até a realização do ensaio de *immunoblotting* com IgE.

### Obtenção do veneno da vespa

O veneno da espécie *Agelaia pallipes* foi extraído conforme método previamente descrito<sup>3</sup>. Após a captura, os inse-

tos são imediatamente congelados a -80°C e levados ao laboratório para confirmar a identificação taxonômica. As vespas são então dissecadas e o reservatório do veneno (glândula) é extraído com o uso de microbisturis. Estes reservatórios são cuidadosamente lavados em solução isotônica, perfurados e agitados suavemente em solução isotônica por cinco minutos a 4°C e centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante é usado como extrato do veneno.

### Eletroforese Bidimensional

Com a eletroforese bidimensional (2D) fez-se a separação e identificação de proteínas presentes em uma amostra pelo deslocamento em duas dimensões divergentes 90° uma da outra, aumentando a resolução da separação. No primeiro passo as proteínas são separadas de acordo com o ponto isoelétrico (pI), e na segunda dimensão, a separação ocorre baseada no peso molecular (PM). Cada "spot" obtido após uma corrida utilizando eletroforese 2D, corresponde a uma proteína.

Na preparação da amostra utilizamos quantidade de veneno correspondente ao conteúdo de 50 glândulas de veneno da espécie *Agelaia pallipes*, contendo aproximadamente 300µg de proteína total. Além disso, usamos o veneno dialisado, para diminuir a quantidade de sal e melhorar a focalização isoelétrica.

Após a diálise, a amostra foi diluída diretamente na solução de rehidratação. Na focalização isoelétrica utilizamos gradientes de pH imobilizados (IPG) em tiras de gel com faixa de pH 3,0 a 10,0 e com 7 cm de comprimento (Immobiline DryStrip gels - Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). Antes da corrida eletroforética, estas tiras foram reidratadas durante doze horas em solução contendo uréia a 8M, CHAPS 0,5%, 0,5% da solução tampão IPGE, Ditiotretol a 0,2% e azul de bromofenol 0,002%. A corrida eletroforética foi processada na cuba de eletroforese *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System* (Amersham Biosciences, England) com um gradiente de voltagem aumentado gradualmente (500V por 30min - 2x, 1000V por 30 min - 2x, e 5000V por 1:30h, acumulando no final um total de 8000V/h.

A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob gradiente de 15%, em temperatura ambiente, com corrente constante de 30-45mA para cada gel, por cinco a seis horas, em cuba de eletroforese vertical Hoefer SE 600 (Ruby) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) para dois géis.

Em todos os experimentos, a eletroforese foi feita em dois géis simultaneamente. Um dos géis foi corado com *coomassie*. As proteínas do outro gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose para *immunoblotting* com IgE.

### Western blotting para detecção de antígenos reconhecidos por IgE

As frações protéicas separadas em SDS-PAGE foram transferidas eletroforéticamente do gel para membranas de nitrocelulose (Hybond-C extra, Amersham Bioscience, Buckingham, Inglaterra). Para a transferência utilizamos uma cuba de transferência *semi-dry* (Hoefer® Semiphor™, Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA). Em um reservatório contendo tampão de transferência montou-se um "sanduíche" na seguinte ordem: 6-8 pedaços de folhas de papel de filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel, 6-8 pedaços de folha de papel de filtro. A transferência foi realizada em 45 minutos a 250V. Após o término da transferência, a membrana foi corada com *Ponceau* a fim de se testemunhar a eficiência da transferência. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-tween/leite 5% por duas horas, em temperatura ambiente. O soro do paciente sensibilizado (em diluição 1:5) foi incubado *overnight* a 4°C com

a membrana e, após lavagem com TBS-tween (5 x 10 minutos). A membrana foi incubada com o anticorpo anti-IgE biotilado (Biotin mouse anti-human IgE, Zymed, San Francisco-CA, USA) diluído a 1:250 em TBS-leite 5% por duas horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem por 5 x 10 minutos com TBS, foi incubado com o conjugado estreptavidina-peroxidase (HRP-streptavidin conjugate, Zymed, San Francisco-CA, USA) diluído a 1:250 em TBS-leite 5% por duas horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem com TBS-Tween a membrana foi fixada a uma folha de acetato para detecção com Enhanced Chemoluminescence (ECL).

#### **Detecção com sistema Enhanced Chemoluminescence -ECL**

Para a detecção das proteínas com ECL (de alta sensibilidade para IgE) foram misturados volumes iguais da solução de detecção 1 e solução de detecção 2 do *Kit* de Reagentes para imunodetecção ECL (*ECL Western Blotting detection reagents - RNP2106*, Amersham Biosciences, Buckingham, England) permitindo volume total suficiente para cobrir as membranas. O excesso de tampão de lavagem da membrana foi retirado e a mesma foi colocada com as proteínas para cima, em superfície adequada (folha de acetato). A mistura dos reagentes de detecção foi pipetada sobre a membrana, e incubada por um minuto em temperatura ambiente. Após retirar o excesso dos reagentes, outra folha de acetato foi colocada sobre a membrana, retirando bolhas de ar e, em um cassete de Raios X, uma folha de filme de Raios X 18x20cm - *Hyperfilm* (Amersham, Buckingham, England) foi colocada sobre a membrana e o cassete fechado. Após exposição por 15 segundos, o filme foi removido e revelado.

#### **Processamento das proteínas**

Após a coloração com *Coomassie blue* do gel correspondente ao gel transferido para a membrana de nitrocelulose, os *spots* de interesse foram recortados do gel, e depois lavados com solução de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 50mM em acetonitrila (ACN) 50%, até completa descoloração e remoção de SDS. Após descoloração, os pedaços de gel recortados foram completamente desidratados com acetonitrila 100% por cinco minutos e secados em *speedvac*. Depois, foram reidratados com 30 $\mu\text{L}$  de solução contendo 0,3  $\mu\text{g}$  de tripsina em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM e após foi adicionado 50 $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  200mM. A reação foi mantida a 37°C por 24 horas para completa digestão. Depois da digestão, os peptídeos foram extraídos pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 50%/TFA 2,5%, em temperatura ambiente por três horas. O procedimento foi repetido e os sobrenadantes combinados. As amostras foram concentradas em *SpeedVac* até aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  e ressuspensas com mais 5  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 50%/TFA 2,5%.

#### **Identificação das proteínas (Análise Proteômica)**

A etapa seguinte deste projeto foi a identificação destas proteínas reconhecidas pela IgE específica presente no soro de pacientes sensibilizados. Para a identificação inicial, seguindo o método da análise proteômica, as proteínas detectadas no *immunoblotting* foram analisadas no espectrômetro de massa MALDI-ToF.

Após o processo de digestão e extração dos peptídeos, uma pequena quantidade de amostra (0,5 $\mu\text{l}$ ) correspondendo a cada um dos *spots* foi aplicada sobre uma lâmina de metal juntamente com uma matriz de ácido cinâmico e levado para análise no espectrômetro de massa, que fornece a massa molecular dos peptídeos da proteína digerida e fragmentada. O espectro é formado pela massa molecular da sequência de íons peptídicos representados pela razão massa/carga ( $m/z$ ) do íon. Como cada proteína vai apresentar sua sequência única de íons, este espectro é cha-

mado de impressão digital do peptídeo - PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*). As massas moleculares de peptídeos resultantes da digestão são então comparadas com perfis proteolíticos teóricos obtidos de seqüências das bases de dados da Internet, com programas específicos, que permitem identificar proteínas idênticas ou altamente homólogas. Os bancos de dados utilizados para identificação de proteínas são encontrados em servidores domésticos, que são mantidos e atualizados regularmente. Pesquisas em bancos de dados são executadas on-line, ou localmente em réplicas de servidores privados. Os bancos de dados são acessados através de servidores de consulta como: Protein Prospector, PROWL, Peptide search, Mowse, Mascot, entre outros. Além da lista de massas dos peptídeos obtidos na Impressão Digital de Proteínas (PMF), foram fornecidos parâmetros como o agente da clivagem - tripsina, o estado de carga dos peptídeos, a forma de expressão das massas medidas (neste caso - monoisotópica), a tolerância de erro de mais ou menos 1,0 Da.

Na identificação final por PMF, através do site Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>), acessamos o MS-Fit e usando o *SwissProt* como principal banco de dados, alimentamos a busca com os parâmetros já citados. Através do MS-fit/Prospector, dentro de ALL SPECIES, selecionamos VENOM, garantindo uma identificação mais direcionada. Além disso, selecionamos sempre a identificação por HOMOLOGU.

## **Resultados**

A focalização isoeétrica da primeira dimensão foi completada após seis h 20 min acumulando 8716V/h. A separação bidimensional das proteínas do veneno da vespa *Agelaia pallipes*, evidenciou um grande número de proteínas de baixo peso molecular (abaixo de 20 kDa). Entretanto, os experimentos com *immunoblotting* mostraram que as proteínas reconhecidas pela IgE estavam predominantemente localizadas na faixa de peso molecular entre 20 e 38kDa.

O gel com *coomassie* e o *immunoblotting* com a detecção com ECL estão reproduzidos na figura 1 (A e B).

Para a identificação por PMF selecionamos 15 *spots* localizados nas regiões correspondentes às proteínas detectadas no *immunoblotting* (figura 2). Estes *spots* foram recortados e digeridos *in-gel*; depois, os peptídeos extraídos foram pipetados em lâminas metálicas juntamente com uma matriz (ácido cinâmico) para análise no espectrômetro de massa MALDI-ToF. Após "bombardeamento" das amostras com laser (120kV), obtivemos um espectro peptídico para cada *spot*. Exemplo de espectros de PMF e lista de pesos moleculares dos *spots* analisados estão representados na figura 3.

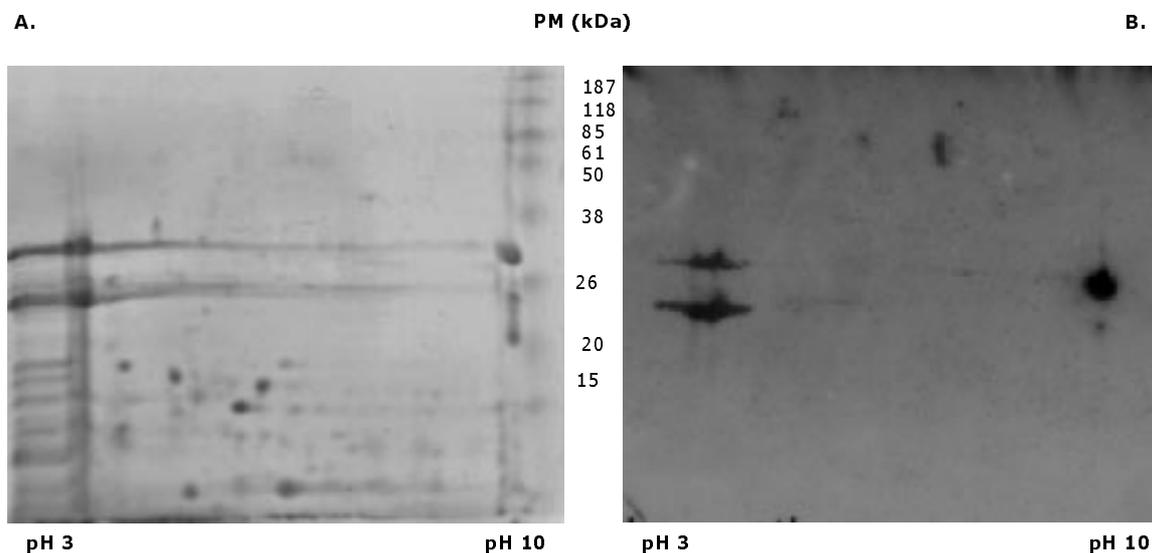
No MALDI-ToF, dos 15 *spots* analisados, somente quatro amostras forneceram espectros com picos suficientes para nova identificação (*spots* 1, 3, 6 e 9). Os resultados da identificação encontram-se resumidos no quadro 1. Foram consideradas as cinco proteínas candidatas com maior escore (*Mowse score*).

Entre as candidatas encontramos várias proteínas descritas no veneno de outras espécies de vespas, mas encontramos também grande quantidade de proteínas descritas no veneno de vertebrados, mais especificamente de serpentes. Para investigar o que estas proteínas candidatas teriam em comum, alinhamos as cinco proteínas candidatas com maior escore (quadro 1) para cada um dos *spots* identificados, e assim, pelo alinhamento dos peptídeos, observamos a semelhança existente entre elas. O alinhamento foi feito utilizando o *site MultAlin*<sup>5</sup> (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

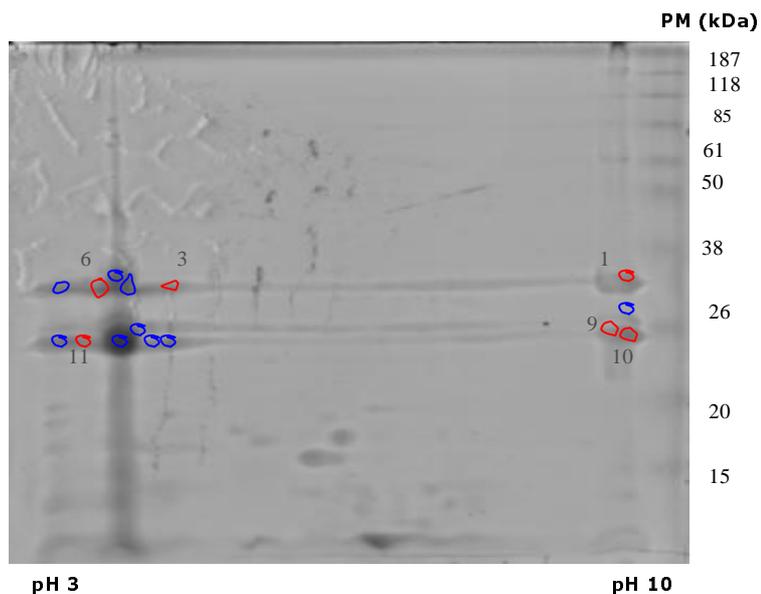
Para o **Spot 1** por exemplo, observamos um domínio compartilhado na porção inicial da cadeia em três das can-

didatas, que compartilham seqüências menores de peptídeos no resto da cadeia com as demais candidatas. Além disso, estas três candidatas são serino-proteases com função trombina-like, o que nos permite inferir que a proteína

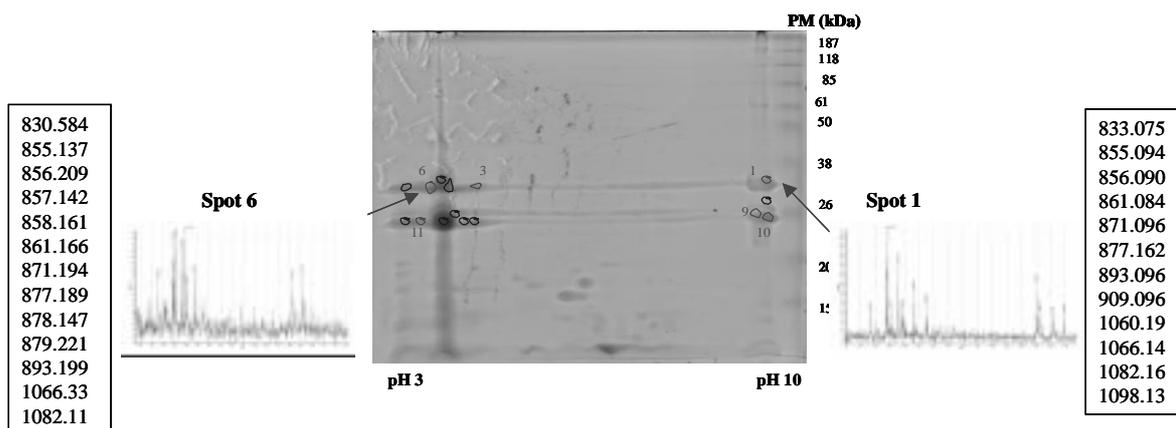
representada pelo **spot 1** também pertence ao grupo das serino-proteases.



**Figura 1** – **A.** Imagem do gel 2D (pH3,0-10,0 - SDS PAGE 15%) com veneno de *Agelais pallipes* – conteúdo de 50 glândulas de veneno. Observa-se maior distribuição de spots na faixa de peso molecular abaixo de 20kDa; **B.** *Immunoblotting* com soro de paciente sensibilizado e anticorpo anti-IgE. Revelação com ECL após exposição de 15 segundos. A membrana foi incubada com soro do paciente sensibilizado na diluição de 1:5. Observa-se a detecção de spots nos extremos de pH 3,0 e 10,0 com peso molecular entre 20 e 38 kDa.



**Figura 2.** Observa-se em destaque os spots selecionados para processamento e posterior análise no MALDI-TOF. Em vermelho os spots que geraram número suficiente de picos no espectro de massas, permitindo identificação pelo PMF.



**Figura 3.** Na figura acima observamos em destaque o espectro de PMF obtido em dois dos spots analisados. A seqüência de picos representa os pesos moleculares (razão m/z) dos íons peptídicos que compõem cada proteína.

**Quadro 1.** identificação por pmf usando resultado de imunoblotting com IgE

Amostra	MOWSE score	Proteína candidata	Espécie	# acesso	PM(Da)/pI	Cobertura (%)
Spot 1	47,6	Cerastobin (Venom serine protease)	<i>Cerastes vipera</i> (serpente)	<u>P18692</u>	3982/9,2	100
	46,8	Venom serine proteinase 2C precursor	<i>Trimeresurus gramineus</i> (serpente)	<u>O13062</u>	28043/8,7	41
	44,5	Venom basic protease inhibitor I homolog	<i>Dendroaspis angusticeps</i> (serpente)	<u>P00980</u>	7071/9,7	83
	34,2	Venom natriuretic peptide	<i>Oxyuranus microlepidotus</i> (serpente)	<u>P83230</u>	4115/8,8	87
	32,1	Ancrod (Venombin A) (Protein C activator)	<i>Agkistrodon rhodostoma</i> (serpente)	<u>P26324</u>	26571/8,6	60
Spot 3	140	Intestinal toxin 1 (Venom protein A)	<i>Dendroaspis polylepsis</i> (serpente)	<u>P25687</u>	8645/9,0	100
	55,7	Ancrod (Venombin A) (Protein C activator)	<i>Agkistrodon rhodostoma</i> (serpente)	<u>P26324</u>	26571/8,6	59
	30,7	Venom allergen 5 (Antigen 5)	<i>Dolichovespula arenaria</i> (vespa)	<u>Q05108</u>	23203/9,2	62
	27,6	Venom serine proteinase precursor	<i>Trimeresurus jrdonii</i> (serpente)	<u>Q9DF68</u>	28614/8,8	74
	27,6	Venom serine proteinase 2 precursor	<i>Trimeresurus flavoviridis</i> (serpente)	<u>O13057</u>	28641/9,2	85
Spot 6	15,6	Ancrod (Venombin A) (Protein C activator)	<i>Agkistrodon rhodostoma</i> (serpente)	<u>P26324</u>	26571/8,6	57
	11,9	Venom serine proteinase 2 precursor	<i>Trimeresurus flavoviridis</i> (serpente)	<u>O13057</u>	28641/9,2	91
	11,3	Venom allergen 5.01 (Antigen 5)	<i>Vespa crabo</i> (vespa)	<u>P35781</u>	22722/9,2	61
	11,3	Venom allergen 5.02 (Antigen 5)	<i>Vespa crabo</i> (vespa)	<u>P35782</u>	22781/8,8	61
	11,2	Venom serine proteinase 2B precursor	<i>Trimeresurus gramineus</i> (vespa)	<u>O13061</u>	28935/5,5	38
Spot 9	140	Intestinal toxin 1 (Venom protein A)	<i>Dendroaspis polylepsis</i> (serpente)	<u>P25687</u>	8645/9,0	100
	55,7	Ancrod (Venombin A) (Protein C activator)	<i>Agkistrodon rhodostoma</i> (serpente)	<u>P26324</u>	26571/8,6	60
	55,1	Venom chymotrypsin inhibitor	<i>Naja naja</i> (serpente)	<u>P19859</u>	6508/8,9	56
	39,8	Desintegrin bitan	<i>Bitis Arietans</i> (serpente)	<u>P17497</u>	9004/5,1	100
	27,6	Venom serine proteinase precursor	<i>Trimeresurus jrdonii</i> (serpente)	<u>Q9DF68</u>	28614/8,8	68

Da mesma forma, alinhamos as proteínas candidatas para os spots 3, 6 e 9 e, com o mesmo raciocínio, identificamos as proteínas correspondentes. Para o **Spot 3**, como

no **spot 1**, a maioria das proteínas candidatas (3/5) têm atividade de serino-proteases e estão presentes no veneno de vertebrados (serpentes), mas encontramos um antígeno

5 do veneno da vespa *Dolichovespula arenaria*, que pelo pareamento de peptídeos também mostra semelhanças com as serino-proteases citadas. Quando comparamos o antígeno 5 com cada uma das serino-proteases separadamente observamos grande número de domínios compartilhados entre estas proteínas.

Com o **Spot 6**, novamente as serino-proteases e o antígeno 5 aparecem entre as proteínas candidatas. A homologia entre as primeiras é bem mais evidente, mas observam-se vários pequenos domínios comuns entre estas e o antígeno 5 nas porções média e terminais das cadeias.

No **spot 9**, a identificação foi mais difícil, pois apenas duas candidatas tinham a atividade comum de serino-proteinase, entretanto, as outras três candidatas, com atividades distintas apresentaram várias seqüências peptídicas em comum na porção terminal da cadeia com as serino-proteinases.

Para a confirmação definitiva de identidade destas proteínas temos como projeto futuro o seqüenciamento de seus aminoácidos.

## Discussão

Neste trabalho, identificamos por PMF as proteínas alergênicas presentes no veneno da vespa neotropical *Agelais pallipes* que são reconhecidas pela IgE específica no soro de um paciente com história de reação sistêmica ao veneno. Estas proteínas alergênicas possuem peso molecular entre 20 e 38 kDa, e são principalmente da família das serino-proteases e o antígeno 5.

Poucos estudos foram realizados sobre a composição dos venenos de vespa, limitando os dados disponíveis em banco de dados de seqüências para a identificação. Os venenos das vespas das famílias *Vespinæ* (prevalentes no Hemisfério Norte), mais extensamente estudados, contêm diversos componentes como fosfolipase A e B, hialuronidase, fosfatase ácida, proteases e nucleotidases<sup>6</sup>. A composição dos venenos de *Vespinæ* é similar entre diferentes espécies, entretanto, pouco se conhece sobre os venenos das vespas neotropicais da família *Polistinae*, como a *Agelais pallipes*.

Os alérgenos presentes nos venenos de himenópteros são geralmente proteínas de 10 a 50 kDa contendo de 100-400 resíduos de amino-ácidos<sup>7</sup>. No caso das vespas, três alérgenos foram inicialmente descritos: antígeno 5, hialuronidase e fosfolipase A1. Mais recentemente foi descrita a presença de proteases no veneno de algumas espécies<sup>8</sup>, portanto os alérgenos que encontramos no veneno da *Agelais pallipes* seguem o padrão de proteínas já descritas. Na identificação obtida por PMF verificamos a presença freqüente do antígeno 5 entre as proteínas candidatas. Este achado já era esperado, uma vez que o antígeno 5 já é reconhecidamente uma proteína antigênica presente nos venenos de vespa. A família do antígeno 5 apresenta entre 202 a 212 resíduos de aminoácidos com oito resíduos de cisteína, com pI entre 8,6 e 9,5<sup>9</sup>, correspondendo aos achados deste estudo.

Outro grupo de proteínas recorrente na identificação foi o das serino-proteases. As proteases foram recentemente descritas em veneno de vespas da família *Polistinae* da qual faz parte a *Agelais*<sup>8</sup>. O nosso trabalho foi o primeiro a identificar proteínas alergênicas no veneno de *Agelais pallipes* pela análise proteômica, e o primeiro a relatar a presença de proteases como alérgenos no veneno desta espécie. O que nos chamou a atenção foi que as proteínas candidatas faziam parte de veneno de espécies vertebradas, mais especificamente serpentes de diferentes espécies. Observamos ainda que as mesmas conservam várias seqüências de peptídeos com as proteínas experimentais, o que aparentemente não foi ainda descrito, pois não encon-

tramos citações na literatura sobre esta similaridade. Como a *Agelais* possui hábitos alimentares carnívoros, sendo inclusive conhecida em algumas regiões como "carniceiro", a presença das proteases no veneno poderia ser justificada pela atividade que estas enzimas teriam na degradação dos tecidos de suas presas, facilitando sua digestão.

Como já citado nos resultados, o próximo passo seria realizar o seqüenciamento de aminoácidos destas proteínas para obter com precisão sua identificação. A partir do seqüenciamento poderemos estudar a homologia entre as proteínas do veneno da *Agelais* e a de outras espécies já descritas, uma vez que estes alérgenos podem apresentar diferentes graus de homologia e identidade de seqüência, variando de 60% para fosfolipases e antígeno 5 a cerca de 80% para as hialuronidasas<sup>10</sup>. Nenhum estudo até o momento foi feito com as proteases.

Em conclusão, com a eletroforese bidimensional e o *immunoblotting*, pudemos caracterizar as proteínas antigênicas do veneno da *Agelais pallipes* como proteínas com peso molecular entre 20 e 38 kDa, identificadas pela análise proteômica como antígeno 5, além das serino-protease. Mostramos ainda seqüência de identidade parcial entre os componentes deste veneno e proteínas de venenos de vertebrados (serpentes). Para melhorar a precisão do diagnóstico e tratamento dos pacientes sensibilizados ao veneno da *Agelais*, será necessário o seqüenciamento das amostras para uma identificação mais precisa.

Financiamento: FAPESP

## Referências Bibliográficas

1. Muller UR. Insect venom. Ther Umsch. 1994; 15(1): 38-44.
2. Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of Hymenoptera venom hypersensitivity: a meta-analysis. Clin Ther 2000, 22(3): 1166-71.
3. Castro FFM, Palma MS, Brochetto-Braga MR, Malaspina O, Lazaretti J, Baldo MAB, et al. Biochemical properties and study of antigenic cross-reactivity between Africanized honey bee and wasp venom. J Invest Allergol Clin Immunol 1994; 4(1): 37-41.
4. Esher SHG, Castro APBM, Croce J, Palma MS, Malaspina O, Palma MFM, et al. Estudo dos métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico de alergia a Hymenopteros: análise crítica. Rev. bras. alerg. imunopatol. 2001; 24(2):46-53.
5. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl Acids Res 1988, 16 (22): 10881-10890.
6. Nakajima T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: Piek T (ed). Venoms of the hymenoptera. Academic Press, London, pp309-327.
7. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. Int Arch Allergy Immunol 2000; 123:99-106
8. McNairy MM, Gastmeyer J, Pantera B, Hoffman DR. Isolation of paper wasp venom proteases by affinity chromatography. J Allergy Clin Immunol 2000, 105:S57.
9. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venom XXV: the amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. J Allergy Clin Immunol 1993; 92: 707-16.
10. Lu G, Villaiba M, Coscia MR, Hoffman DR, King TP. Sequence analysis and antigen cross-reactivity of a venom allergen antigen 5 from hornets, wasps and yellow jackets. J Immunol 1993; 150:2823-2830.

Correspondência:

Dr. Clóvis E. S. Galvão

Departamento de Clínica Médica – Divisão de Imunologia Clínica e Alergia

Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155 / 8º Andar – Bloco III

05403-000 - Cerqueira César - São Paulo - SP

Fone: 0XX-11-30696225

FAX: 0XX-11-30696098

E-mail: cdgalvao@usp.br