

# Predição do Potencial de Alergenicidade em OGMs - estudo de caso

Gene da capa protéica de *Papaya ringspot virus* em mamoeiro transgênico

**Manoel Teixeira Souza Júnior, Ph.D.**  
Pesquisador em Biotecnologia/Genômica da  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
msouza@cenargen.embrapa.br

**Natália Florêncio Martins, Ph.D.**  
Pesquisadora em Bioinformática da Embrapa  
Recursos Genéticos e Biotecnologia  
natalia@cenargen.embrapa.br

Ilustrações cedidas pelos autores

## Alergia, biossegurança de OGMs e uso de Bioinformática na predição de proteínas alergênicas

Um dos pontos principais para a garantia de biossegurança de alimentos geneticamente modificados (OGMs), também conhecidos como transgênicos, é a avaliação do potencial de alergenicidade das proteínas codificadas pelos genes inseridos. Modificações genéticas podem afetar a alergenicidade dos OGMs de duas formas principais: pela introdução de alérgenos ou pela modificação do nível ou da natureza de alérgenos intrínsecos. Os alérgenos podem ser introduzidos pela expressão de proteínas transgênicas, uma vez que as proteínas têm sido apontadas como agentes causadores de diversas alergias (alimentar, esporos, pólen, etc.) (Kleter et al., 2002).

O potencial de alergenicidade de uma proteína não é um parâmetro facilmente previsível, sendo dependente da diversidade genética e da variabilidade da resposta de IgEs<sup>1</sup> específicas. Dada a falta de previsibilidade da alergenicidade, faz-se necessário obter evidências que minimizem as dúvidas quanto ao potencial alergênico da proteína em questão, o que é feito mediante um processo de acessar riscos compostos de diversos passos (European Commission, 2003).

<sup>1</sup> A principal barreira imunológica a proteínas estranhas é a secreção de moléculas IgA, no interior do intestino, a qual se complexa com as proteínas estranhas e bloqueia a sua absorção. As proteínas estranhas que conseguem chegar à circulação são recebidas por anticorpos da classe IgA e IgG, os quais são eliminados do organismo pelo sistema retículo endotelial. Pessoas normais geram anticorpos da classe IgA, IgM e IgG em minúsculas quantidades em reação a antígenos alimentares. Reações mediadas por IgE liberam histamina, prostaglandinas e leucotrienos, produzindo uma reação alérgica típica imediata, com sintomas que aparecem em minutos.

Reações não mediadas por IgE produzem os sintomas em horas ou dias. Reações não mediadas por IgE e de mecanismo desconhecido causam um aumento da reatividade a um determinado alimento sem o envolvimento do sistema imune, as quais chamamos de intolerância alimentar. (Theron G. Randolph: *An Alternative Approach to Allergies - The New Field of Clinical Unravels the Environmental Causes of Mental and Physical Ills*. Harper & Row, Publishers, New York, 1989).

Em 2001, a FAO e a OMS definiram como árvore de decisão para alergenicidade (Ver anexo) uma série de condições que definem o potencial alergênico de uma nova proteína introduzida em alimentos geneticamente modificados. Esse enfoque utiliza estratégias que investigam a fonte do gene, a homologia da sequência com alérgenos conhecidos, as reações de associação com IgEs de fonte sorológica de indivíduos alérgicos e investiga algumas propriedades físico-químicas da proteína codificada pelo gene introduzido.

A análise bioinformática das sequências é fundamental para detectar e prever propriedades estruturais, reações adversas e o potencial de alergenicidade dessas proteínas. A FAO e a OMS recomendam uma padronização nas metodologias utilizadas para a árvore de decisão.

A comparação das sequências de interesse com bancos de dados de alergênicos como o Structural Database of Allergenic Proteins - SDAP (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>), e outros servidores disponíveis na internet, usando algoritmos de buscas comparativas como o FASTA e BLAST, é o método internacionalmente reconhecido para tal detecção. O método atual permite encontrar medidas de similaridade e/ou identidade com proteínas conhecidas como alergênicas.

PRSV BR	SKNIDDDYQSDCCSSNTHVFCSPKNEAVDAGLNEKPKKECEKNC	40
PRSV HA5-1	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCSKNEAVDAGLNEKPKKEKENC	40
PRSV BR	BEKELEKQKPKKEKDCASNGNDVSTSTRTGERLRCVNVVGTST	79
PRSV HA5-1	REKELEKQKPKKEKDCASNGNDVSTSTRTGERLRCVNVVGTST	80
PRSV BR	GTFTVPRPKSFTDKMLERIKGKTVLNLNLHLIQYNPCQIID	119
PRSV HA5-1	GTFTVPRPKSFTDKMLERIKGKTVLNLNLHLIQYNPCQIID	120
PRSV BR	ISNTRATQSQFEKWKYEGVRNDYGLNENEMQIVLNLGLMVMWC	159
PRSV HA5-1	ISNTRATQSQFEKWKYEGVRNDYGLNENEMQIVLNLGLMVMWC	160
PRSV BR	IENGTSEDISGWWVMDGETQVVCYPIKPLIEHATPSFRQII	199
PRSV HA5-1	IENGTSEDISGWWVMDGETQVVCYPIKPLIEHATPSFRQII	200
PRSV BR	MAHFSNAAEAYIAKRNATERYMERYGIKRNLTDISLARYA	239
PRSV HA5-1	MAHFSNAAEAYIAKRNATERYMERYGIKRNLTDISLARYA	240
PRSV BR	FDFYEVNSKTPCRAREAHMCMKAAALRNTSRMFMGMDGSV	279
PRSV HA5-1	FDFYEVNSKTPCRAREAHMCMKAAALRNTSRMFMGMDGSV	280
PRSV BR	SNKEENTERHTVEDVNRIMHSLIGMFRN	306
PRSV HA5-1	SNKEENTERHTVEDVNRIMHSLIGMFRN	307

Figura 1. Alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas capsídicas dos isolados brasileiro (BR) e havaiano (HA5-1) de *Papaya ringspot virus* (PRSV) utilizados como doadores de gene *cp* para a produção dos mamoeiros transgênicos do Brasil e dos EUA, respectivamente. Tarja vermelha mostra localização do epítipo EKQKEK na proteína capsídica do isolado havaiano.

Similaridades em seqüências primárias podem sugerir reações alérgicas decorrentes do aparecimento de regiões específicas de apresentação às imunoglobulinas epitópos<sup>2</sup>.

Quanto à análise de homologia em seqüências de proteínas introduzidas, recomenda-se o uso de bancos de dados internacionalmente conhecidos como o SwissProt, TrEMBL, que contêm seqüências de aminoácidos da grande maioria dos alérgenos dos quais se conhecem as reações alérgicas.

A avaliação das seqüências através das ferramentas da bioinformática auxiliam na predição de reações cruzadas e de eventuais reconhecimentos pelas imunoglobulinas do tipo IgE. O *CODEX alimentarius* considera como potencialmente alergênica a proteína que possuir 35% de identidade com uma extensão (janela) de 80 aminoácidos ao longo de toda a seqüência protéica; contudo, esse parâmetro ainda está sendo discutido pela comunidade internacional (Hileman et al., 2002). Já organizações internacionais como a FAO e a OMS sugerem oito

aminoácidos contíguos como o número ideal, enquanto que o ILSI/IFBC determina seis aminoácidos contíguos. O segmento idêntico deve ser considerado com base na similaridade química dos aminoácidos, cientificamente justificada de modo que evite resultados falso-positivos (European Commission, 2003).

Recentemente, Hileman e colaboradores, que buscavam identidades em segmentos contíguos de 6, 7 e 8 aminoácidos idênticos, compararam, usando o algoritmo FASTA, seqüências de seis endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (inseticidas), três seqüências de proteínas alimentares não alergênicas e 50 proteínas de milho selecionadas aleatoriamente. Os autores concluíram que o algoritmo usado é o mais eficiente e o que melhor prediz para reações cruzadas entre proteínas alergênicas, e sugere que o segmento de oito aminoácidos estabeleça uma margem maior de segurança para a predição de alergenicidade. Além disso, os autores apontaram que o segmento de seis aminoácidos idênticos foi o que produziu um maior número de falsos positivos.

### Epítipo potencialmente alergênico na capa protéica do *Papaya ringspot virus* (PRSV)

Recentemente, Kleter e Peijnenburg publicaram um trabalho na revista BMC Structural Biology (Kleter et al., 2002). Nessa publicação os autores propõem uma metodologia

**Tabela 1 Populações de mamoeiros transgênicos transferidos para a Embrapa Mandioca e Fruticultura.**

População	Geração	Descrição
Embrapa PTP01	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM1a
Embrapa PTP02	R1	População originária de cruzamento controlado entre linhas Ro UM7d e Ro UM1a
Embrapa PTP03	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM1g
Embrapa PTP04	R1	População originária de cruzamento controlado entre linhas Ro UM7d e Ro UM11d
Embrapa PTP05	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM11d
Embrapa PTP06	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM15b
Embrapa PTP07	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM18e
Embrapa PTP08	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS1j
Embrapa PTP09	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS7f
Embrapa PTP10	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS8b
Embrapa PTP17	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TL6b
Embrapa PTP18	R2	População obtida por autofecundação controlada de planta R1 resultante de cruzamento entre linhas Ro UM7c e UM1g
Embrapa PTP28	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM6h

<sup>2</sup> **Epitopos** – O epítipo é constituído por um grupo de átomos, que formam configurações específicas tridimensionais, estereoespecíficas de tamanho limitado (em média na ordem de um tri a um hexassacarídeo, ou de um tri a um decapeptídeo), na superfície da molécula imunogênica. São as estruturas que induzem a imunogenicidade de uma molécula (regiões ditas imunopontes) e seus determinantes específicos antigênicos (epitopos ou locais conformacionais ou seqüenciais) relacionam-se mais com zonas distintas da moléculas. Atualmente, somente algumas moléculas de plantas são conhecidas como epitopos - que têm afinidade por IgEs. Uma coleção dessas moléculas foi organizada na forma de uma base de dados disponível no endereço: <http://www.csl.gov.uk/allergen/Index.htm>.

de avaliação de casos potencialmente alergênicos e estendem as buscas comparativas a bancos de dados, incluindo o *pipeline* a predição de alergenidade pelo método de Hoop & Woods (1981) e testes sorológicos para proteínas cuja identidade com alergênicos fosse de seis ou sete aminoácidos.

Naquele artigo, a metodologia proposta foi aplicada em 33 proteínas transgênicas e suas predições de alergenidade foram discutidas. O procedimento foi dividido em duas partes: primeiramente, foi extraída da literatura internacional uma busca de epitopos lineares, em particular, de proteínas alergênicas; em seguida, a lista de proteínas alergênicas foi comparada com o conjunto de proteínas transgênicas.

O segundo passo da análise foi a predição de alergenidade através do algoritmo computacional descrito em Hoops & Woods (1981). Subseqüentemente, foi verificado se a região predita como antigênica da proteína coincidia com a seqüência de proteína alergênica. Esse passo foi particularmente útil para os casos onde os dados da literatura eram escassos.

Como resultado da metodologia aplicada, 22 proteínas apresentaram resultados positivos com segmentos de seis ou sete aminoácidos. Três dessas foram identificadas como potencialmente alergênicas [PRSV CP - proteína capsídica do *Papaya ringspot vírus* (PRSV) (gi593497), acetolactato sintase GH50 e glicofosfato oxidoreductase. Os demais casos foram claramente negativos, como a Cry1Ac.

A análise da capa protéica (CP) do vírus causador da doença denominada “Mancha Anelar” ou “Mosaico”, o PRSV, em especial o isolado do papaya havaiano HA 5-1, doador do gene de resistência nas variedades transgênicas Rainbow e SunUp, cultivadas no Havaí desde 1998, apresentou o segmento **EKQKEK** idêntico a uma proteína alergênica de nematóide, sendo assim classificado como **potencialmente alergênico pelo método de predição**. Para a seqüência **EKQKEK**, não foram encontrados dados na literatura que descrevam a potencial associação a IgEs. Portanto, os autores sugeriram que o potencial alergênico da proteína transgênica presente nos mamoeiros havaianos fosse confirmado por testes clínicos e/ou sorológicos.

## Anexo I Árvore de Decisão FAO

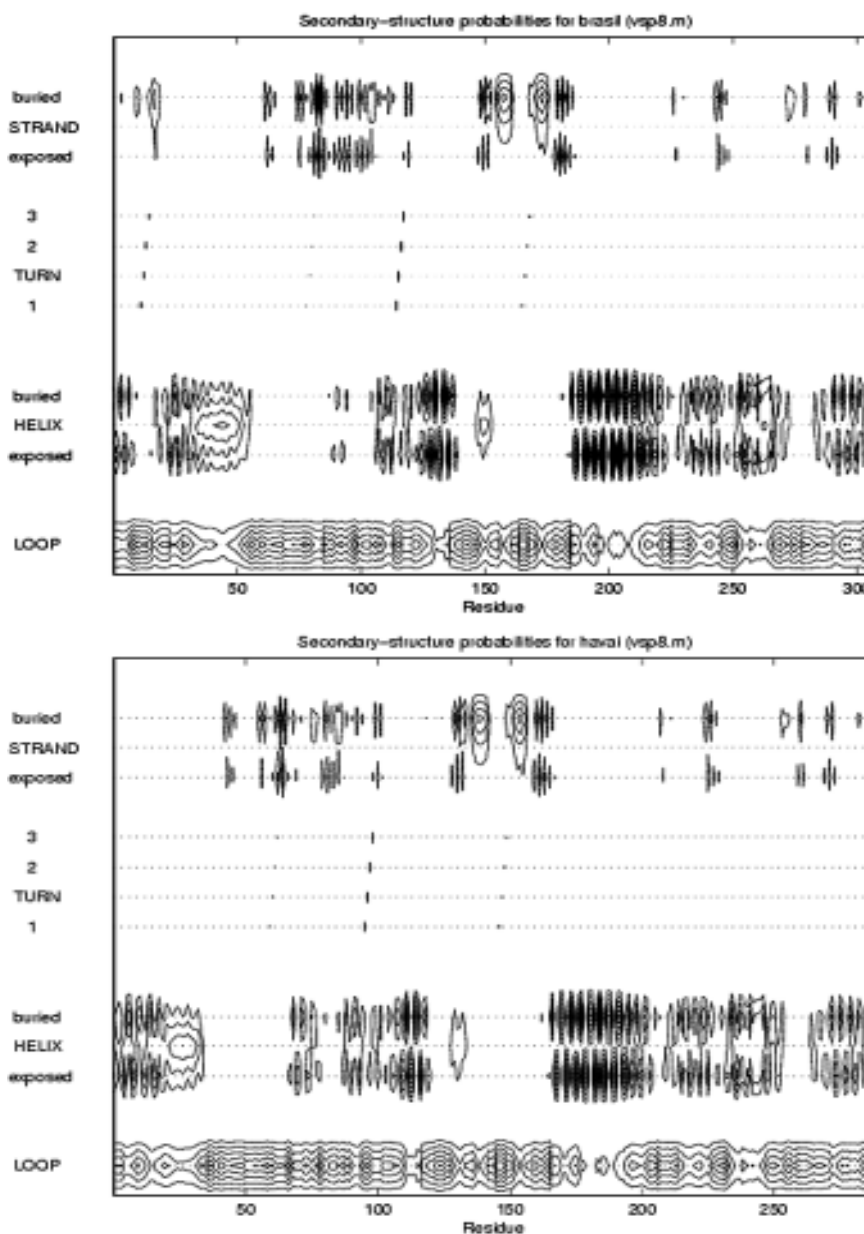


Figura 2. Estrutura secundária das proteínas capsídicas dos isolados brasileiro (BR) e havaiano (HA5-1) de *Papaya ringspot vírus* (PRSV) utilizados como doadores de gene *cp* para a produção dos mamoeiros transgênicos do Brasil e dos EUA, respectivamente.

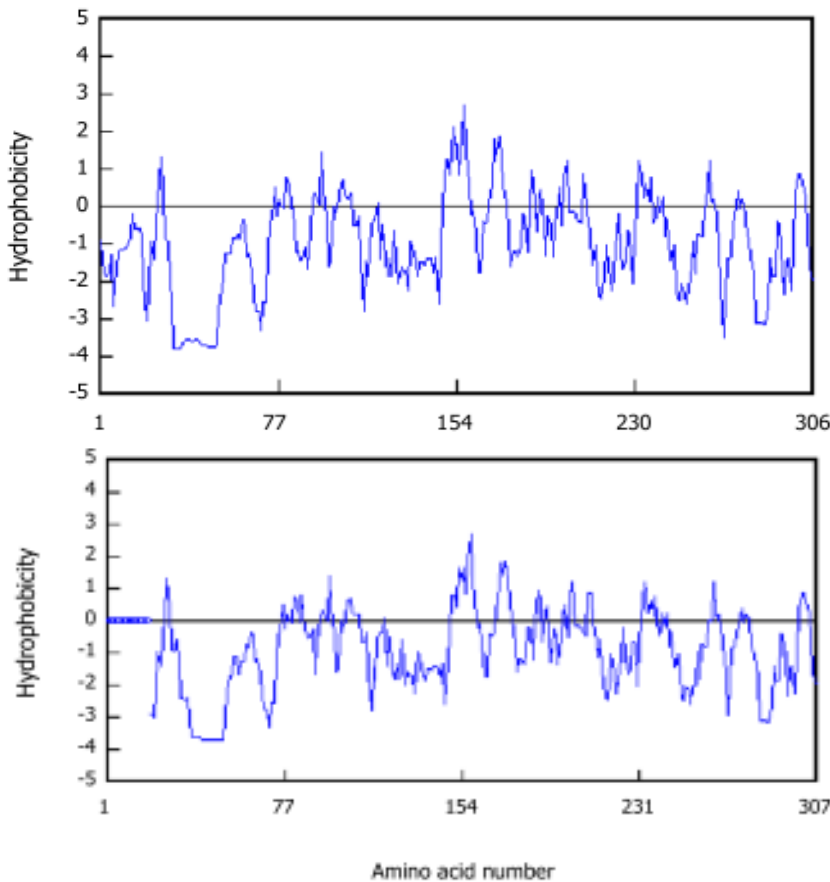


Figura 3. Hidrofobicidade das proteínas capsídicas codificadas pelos genes *cp* de *Papaya ringspot virus* presente nos mamoeiros transgênicos brasileiros e havaianos. O quadro superior mostra a hidrofobicidade da proteína do isolado PRSV BR (Souza Jr., 1999), e o quadro inferior mostra a hidrofobicidade da proteína do isolado PRSV HA 5-1 (Acesso gi593497 no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

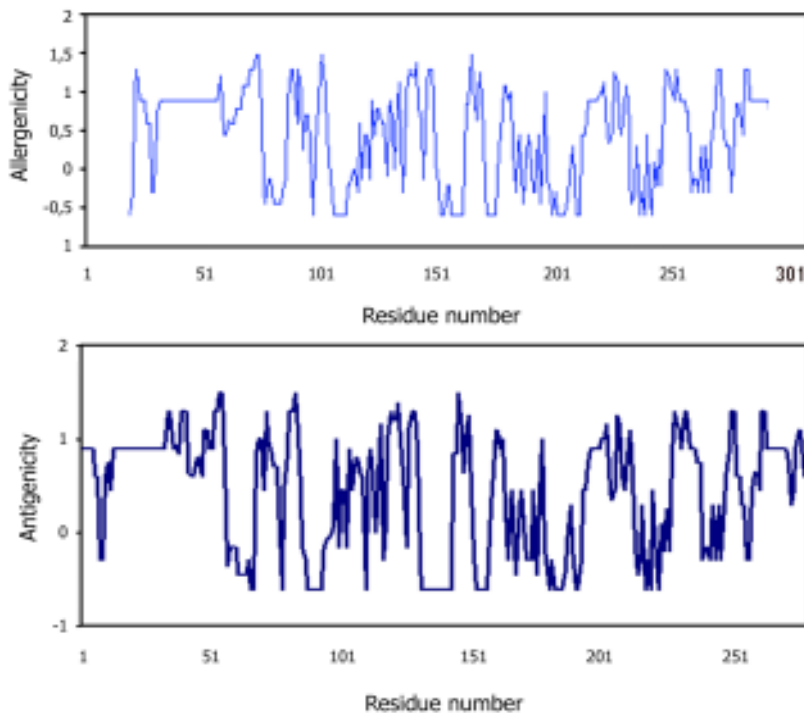


Figura 4. Gráfico de antigenicidade gerado pelo método Hopp e Woods (1981) da sequência das proteínas capsídicas codificadas pelos genes *cp* de *Papaya ringspot virus* presente nos mamoeiros transgênicos brasileiros e havaianos. O quadro superior mostra a antigenicidade da proteína do isolado PRSV BR (Souza Jr., 1999), e o quadro inferior mostra a antigenicidade da proteína do isolado PRSV HA 5-1 (Acesso gi593497 no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## Avaliando a presença do epítipo EKQKEK na capa protéica dos isolados brasileiros de PRSV, e nos mamoeiros transgênicos produzidos pela Embrapa

Há pouco mais de dez anos, a Embrapa, por intermédio de suas unidades de Cruz das Almas (Embrapa Mandioca e Fruticultura) e Brasília (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), realiza um trabalho de cooperação técnica com a New York State Agriculture Experiment Station, Cornell University, na cidade de Geneva, no estado de New York, nos EUA, com vistas a desenvolver mamoeiros (*C. papaya*) transgênicos resistentes à Mancha Anelar, que é um dos principais fatores limitantes dessa cultura no Brasil.

Em abril de 2001, foram incorporadas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no programa de melhoramento genético de mamoeiro, desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura, treze populações de mamoeiros transgênicos (Tabela 1). Os trabalhos de pesquisa da última fase de desenvolvimento de mamoeiro transgênico resistente à PRSV feitos pela Embrapa compõem um dos projetos que fazem parte [“Avaliação de segurança alimentar e ambiental de mamoeiro geneticamente modificado para resistência ao vírus da mancha anelar (PRSV)”] da rede de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados, aprovada em 2002, no Macroprograma 1 da Embrapa.

O gene *cp* utilizado nas construções gênicas aplicadas na transformação genética de mamoeiros das variedades ‘Sunrise’ e ‘Sunset’ Solo, que visam à resistência a isolados brasileiros de PRSV, foi obtido a partir de um isolado de PRSV coletado na região de Nova Viçosa, no Estado da Bahia. As populações transferidas para a Embrapa Mandioca e Fruticultura foram originadas de plantas que continham uma das três versões do gene *cp*, e são elas: UM (untranslatable medium), TS (translatable short) e TL (translatable large) (Souza Jr., 1999). “Untranslatable” significa não-traduzido, isto é, o gene é transcrito, mas o mRNA produzido a partir dele não gera proteína devido à presença de códon terminador inserido a alguns

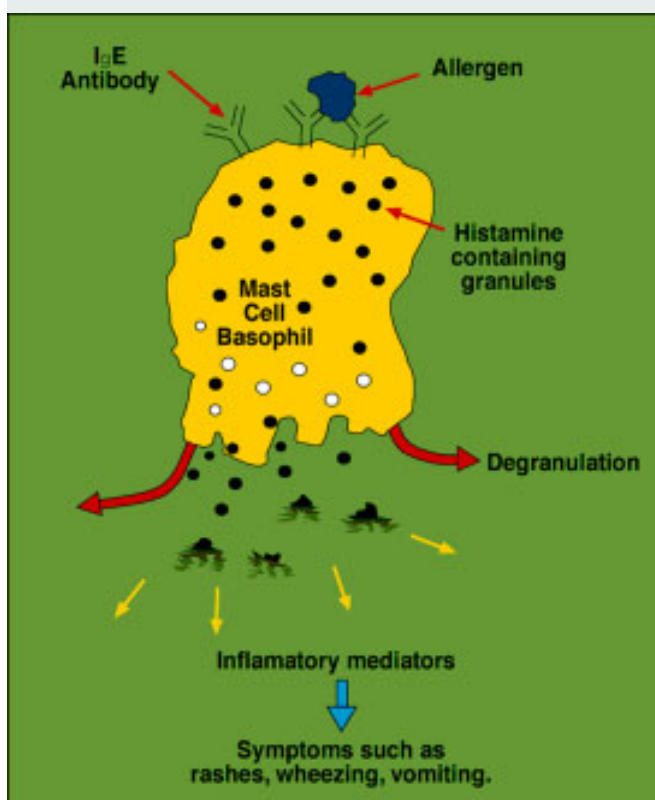
## Anexo II

### O que é alergia alimentar?

Nosso corpo se protege de infecções através do sistema imunológico. Nós produzimos moléculas, chamadas anticorpos, que reconhecem o agente causador da infecção. Existem diferentes tipos de anticorpos: aqueles que estão envolvidos em reações alérgicas chamam-se **IgE**. Nós sabemos que as moléculas de IgE são normalmente produzidas em resposta a infecções causadas por parasitas, como o agente causador da malária, por exemplo. Ainda não conhecemos a causa, mas algumas pessoas produzem IgE para outros agentes não parasitas, como o pólen e alguns alimentos. Nessas reações de reconhecimento são deflagrados os sintomas de alergia, como febre, tontura, dores de cabeça e outros.

As moléculas de IgE agem como etiquetas que se aderem às moléculas advindas do alimento ou do pólen, chamadas alérgenos. Quando alguém tem uma alergia alimentar e ingere o alérgeno, as IgEs atacam as moléculas « invasoras » e disparam as reações em cascata as quais caracterizam o processo alérgico. Um dos efeitos comuns das IgEs associadas às células basófilas é a liberação de grânulos de histamina, que, por sua vez, causam as reações inflamatórias que são percebidas pelos sintomas alérgicos.

### Alergia ou Intolerância?



A tolerância imunológica é definida como a incapacidade específica adquirida, total ou parcial, por um indivíduo que desenvolve uma resposta imune humoral normal ou a mediação celular a um antígeno ou a diversos epitopos de um certo antígeno contra o qual ele normalmente não desenvolveria. Um indivíduo dito tolerante possui a capacidade de responder a outros antígenos administrados ao mesmo tempo que o primeiro, que pode ou não bloquear seu potencial de resposta imune. Em outras palavras, a tolerância imunológica é também específica a um antígeno.

Uma outra coleção de sintomas são relatados em pessoas que são sensibilizadas por alimentos, como dores de cabeça, dores musculares e nas juntas e fadiga. Esse conjunto é comumente conhecido como intolerância alimentar. Ainda assim, conhece-se muito pouco das reações que causam a intolerância e que podem se agravar para o diagnóstico de alergia.

Existem exceções: conhece-se bem a doença Celíaca (<http://www.concordia.psi.br/~celiaco/doenca.htm>) e a intolerância à lactose. Na doença Celíaca, as reações alérgicas são deflagradas pela ingestão de glúten (derivado de trigo, aveia e outros cereais). A intolerância à lactose não se caracteriza como alergia, mas causa alguns sintomas como a alergia ao leite com dores abdominais e diarreia. (<http://www.celiac.org>).

códons após o códon iniciador. “Translatable” significa que há a tradução completa desse gene.

A versão do gene *cp* do isolado PRSV HA 5-1 utilizado para a produção do mamoeiro transgênico havaiano (Fitch et al., 1992) é uma versão curta do gene *cp* (Ling et al., 1991) e não apresenta a seqüência de nucleotídeos necessária para traduzir a sua extremidade N. Essa é a razão para a falta dos dezenove primeiros aminoácidos que estão presentes na proteína capsídica do isolado Brasil. Bahia - ou PRSV BR (Figura 1).

Sob a ótica do método de predição descrito por Kleter et al. (2002), analisamos a presença do epitopo **EKQKEK** e do potencial alergênico deste na proteína expressa pelo gene da capa protéica (*cp*) encontrado nos mamoeiros transgênicos desenvolvidos por Souza Jr. (1999) e liberados para o programa de melhoramento genético de *C. papaya* desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Quanto à presença do epitopo, observamos que o alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas do capsídeo dos isolados BR e HA 5-1 mostra que o epitopo **EKQKEK**

não está presente no isolado brasileiro (Figura 1). No lugar dele, é encontrado o epitopo **EKQKKK**. O gráfico do alinhamento mostra que as regiões variáveis da proteína são pontuais e distribuídas ao longo da seqüência. Algumas mutações observadas entre os resíduos 33, 38, 44 e 54 são mais significativas para a estrutura da proteína.

A predição da estrutura secundária das proteínas do isolado do Havaí indica que os resíduos do epitopo exibem uma tendência a construir uma estrutura em forma de alça (loop). Enquanto a análise da proteína do isolado

Brasil	SKNIDDDYQSDCSSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKKECEKCEEK.EBKCKKKEKDDASYGN
DF P	SRSIDDDYQPVCGSNHVFHCSKNEAVDAGLNEKRKKEKKEKCEKKEEBKCKEKEKDDASDGN
DF W	SRSTDDYQLVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGSNEKIKKKEKCEKEREKCKEKEKDDASDGN
CE P	SRSTYDYQLVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLSEKIKKKEKCEKEREKCKDKDKDASDGN
CE W	SRSTDDYQLVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKIKKKEKCEKEREKCKEKEKDDASDGN
BA-CA	SRNVDYQSVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKKEKCEEK.EBKCKKKEKDDASYGS
BA-IT1	SRSIDDDYQ SARSSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKKEKCEKKEEBKCKEKEKDDGVSDGN
BA-IT2	SRSIDDDYQ SARSSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKKEKCEKKEEBKCKEKEKDDGVSDGN
ES	SRSIDDDYQSVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKKEKCEKKEEBKCKEKEKDDASDGN
PB	SRSTDDYQFVCRSNTHVHFHCSKNEAVDAGLSEKIKKKEKCEKEREKCKEKEKDDASDGN
PE	SSNTDDYQFVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKIKKKEKCEKEREKCKEKEKDDVAGDGN
SP	SRSIDDDYQPDCCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKKEKCEKKEEBKCKEKEKDDNASDGN
PR	SRNIDDDYQSVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKKEKCEEK.EBKCKKKEKDDASYGS

Figura 5. Alinhamento de seqüências de aminoácidos – 60 primeiros aminoácidos do terminal N - das proteínas capsídicas de 13 isolados brasileiros de *Papaya ringspot virus* (PRSV). O isolado Brasil é o doador do gene *cp* utilizado para produzir os mamoeiros transgênicos brasileiros. Denominação dos isolados: DF P (Brasília, biótipo P), DF W (Brasília, biótipo W), CE P (Guauiúba, Ceará, biótipo P), CE W (Aracoiaba, Ceará, biótipo W), BA-CA (Cruz das Almas, Bahia), BA-IT1 (Itabela, Bahia – isolado 1), BA-IT2 (Itabela, Bahia – isolado 2), ES (Linhares, Espírito Santo), PB (Alhandra, Paraíba), PE (Camaragibe, Pernambuco), SP (Piracicaba, São Paulo), PR (Paranavaí, Paraná). A tarja vermelha mostra a posição do primeiro epítipo, enquanto a tarja azul mostra a posição do segundo epítipo.

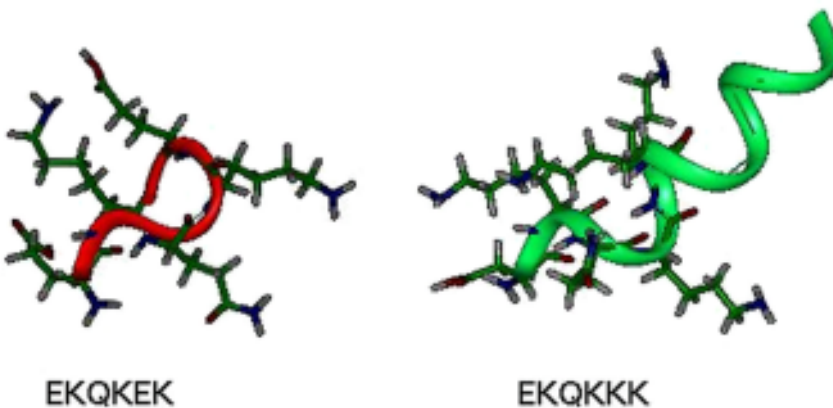


Figura 6. Estrutura tridimensional prevista pelo método de modelagem molecular por homologia dos peptídeos das proteínas capsídicas codificadas pelos genes *cp* de *Papaya ringspot virus* presente nos mamoeiros transgênicos brasileiros e havaianos.

do Brasil, doador do gene *cp* presente nas plantas transgênicas, mostra uma tendência a formar uma estrutura em forma de hélice (Figura 2).

A predição de hidrofobicidade e antigenicidade para a proteína do capsídeo do isolado brasileiro e do isolado havaiano (gi 593497) de PRSV foi realizada usando o algoritmo de Hoop & Woods (1981) e o resultado do cálculo é apresentado nas figuras de 3 a 5.

Uma análise da presença desse epítipo<sup>2</sup> **EKQKEK** na proteína do capsídeo de 13 isolados brasileiros de PRSV, cuja seqüência é conhecida e se encontra disponível na literatura (Souza Jr., 1999; Lima et al., 2002) ou na internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), revelou que esses isolados podem ser agrupados em três classes: os que não apresentam o epítipo (Brasil.Bahia, BA-CA e PR), os que apresentam uma cópia do

epítipo (PE, ES e CE-P), e os que apresentam duas cópias deste (DF-P, DF-W, CE-W, BA-IT1, BA-IT2, PB e SP) (Figura 5).

A predição da estrutura tridimensional do segmento em questão corroborou a predição da estrutura secundária, onde ocorre uma alça na seqüência **EKQKEK** e forma uma estrutura secundária estável em forma de alfa-hélice para a seqüência do mamão brasileiro (Figura 6).

### Referências Bibliográficas

FITCH, M. M., MANSARDT, R. M., GONSALVES, D., SLIGHTOM, J. L & SANFORD, J. C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Bio / Technology**, v.10, p.1466-1472, 1992.

SOUZA JR., M. T. Analysis of the

resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. (**Ph.D. Dissertation**). Ithaca. Cornell University. 1999.

LIMA, R. C. A.; SOUZA JR., M. T., PIO-RIBEIRO, G. & LIMA, A. A. 2002. Sequences of the coat protein gene from Brazilian isolates of *Papaya ringspot virus*. **Brazilian Phytopathology**, 27(2): 174-180.

LING, K. S., NAMBA, S., GONSALVES, C., SLIGHTOM, J. L., & GONSALVES, D. 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. **Bio/Technology** 9:752-758.

HOOP T.P. and WOODS K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc.Natl.Acad.Sci USA**, 78: 3824-3828.

HILEMAN R.E., SILVANOVICH A., GOODMAN R.E., RICE E.A., HOLLESCHAK G., ASTWOOD J.D., HEFLE S.L. 2002 Bioinformatic Methods for Allergenicity Assessment Using a Comprehensive Allergen Database. **Int Arch Allergy Immunol**, 128:280-291.

GENDEL, S. M. 2002. "Sequence analysis for assessing potential allergenicity." **Ann N Y Acad Sci**, 964: 87-98.