

Ciências Biológicas

Isabela Oliveira Sandrini Assugeni

**Análises do uso potencial do alérgeno
recombinante ryPoly p 5 no diagnóstico de
alergia**



Rio Claro
2018

ISABELA OLIVEIRA SANDRINI ASSUGENI

ANÁLISES DO USO POTENCIAL DO ALÉRGENO RECOMBINANTE
ryPoly p 5 NO DIAGNÓSTICO DE ALERGIA

Orientadora: Márcia Regina Brochetto Braga

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

Rio Claro
2018

A851a Assugeni, Isabela Oliveira Sandrini
Análises do uso potencial do alérgeno recombinante ryPoly p 5 no diagnóstico de alergia / Isabela Oliveira Sandrini Assugeni. -- Rio Claro, 2018
31 p. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Márcia Regina Brochetto Braga

1. Antígeno 5. 2. Polybia paulista. 3. Resposta imunológica. I.
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedico este trabalho à minha família, pela oportunidade dessa jornada. Aos meus pais, Rogério Assugeni e Márcia Oliveira por todo amor e força que me deram, e à minha irmã Larissa Assugeni pela parceria de várias vidas. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pela Tua presença em tudo na minha vida, que me faz ter fé e razão pela qual tento ser uma pessoa melhor. Pela luz que me envia todos os dias e me ilumina nas situações mais difíceis que eu enfrento, pela força e amor que me dá, sem os quais eu nada seria.

À minha orientadora Dr^a. Márcia Regina Brochetto Braga, por ter me acolhido como sua aluna, pela oportunidade de entrar da vida de pesquisadora, pelos conselhos, inúmeras explicações e ensinamentos, pela paciência, elogios e críticas, e pela excelente orientação. Agradeço também pela força e motivação que me transmitiu nessas últimas semanas, e por mostrar a importância do trabalho conjunto.

Ao grupo de pesquisa do MolecuLab, e todos os que fazem e os que fizeram parte dele (Amilcar, Felina, Laís, Roger, Murilo, Camila, Gabriel, Geovana, Karina e Lucas) e engrandeceram minha formação científica. Agradeço em especial o Murilo por ter me ensinado as técnicas fundamentais para o sucesso desse trabalho, por ter me ajudado e aconselhado do início ao fim dessa pesquisa, a Geovana pela parceria desde o começo da jornada de pesquisadoras e que enfrentou todas as dificuldades do início da vida no lab comigo, pelas conversas e conselhos esperando a autoclave ou tirando glândulas, e a Camila que consegue sempre ver o lado positivo das coisas e sempre está disposta a ajudar quem precisa.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Translacional, da UNICAMP, que me recebeu de braços abertos para realizar a etapa final deste trabalho. Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, ao Prof. Dr. Luís Gustavo Romani Fernandes que cederam espaço do laboratório e material para a minha pesquisa, e à Débora Moitinho Abram, que me ajudou na técnica de Western Blot e foi sempre muito atenciosa e dedicada comigo.

Às meninas da República Tcheca, Vida e Carol, que me acolheram tão bem no início da graduação e me ajudaram a passar pela experiência de sair de casa pela primeira vez, sempre incentivando a experimentar coisas novas e conhecer pessoas novas, e mostrando que a vida acadêmica é mais do que o que cabe no Lattes.

À BioLogus Jr., empresa júnior da biologia, e à SEBIO, semana de estudos da biologia. Fazer parte dessas famílias foi uma experiência engrandecedora para minha formação profissional e humana, e levarei os aprendizados conquistados para a vida, muito obrigada.

Aos colegas da turma CBI14, aos professores da graduação que proporcionaram experiências únicas na minha vida (como a viagem ao Pantanal), à UNESP, que me proporcionou a oportunidade dessa graduação, ao PIBIC (CNPq) e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

Aos amigos do grupo Gangue do Marrocos, uma família que tive quando a minha estava distante. Agradeço à Carol pela oportunidade de ser minha roommate por quase 3 anos, por estar sempre plena e pronta para ajudar quando precisamos, e não esperar nada em troca, à Mayara por ser a mãezona do grupo, sempre pensar em todos, e oferecer os melhores conselhos, o melhor cafuné e o melhor abraço de todos, à Jaque por estar sempre comigo nos primeiros anos da graduação, pelas conversas, brincadeiras e por estar lá para rir quando engoli um mosquito, à Raquel por todas as duplas que fizemos, por todos os desabafos, todas as festinha que fomos juntas, pela alegria que sempre me proporciona encontrar com você, aos queridos Felipe e João, que me ajudaram a passar por essa graduação com os seus resumos, sempre ajudando quando eu me sentia perdida para fazer um trabalho ou estudar para uma prova, e pela boa companhia para ver um filme no cinema no meio da semana, à Fran por estar sempre feliz e mostrar que em todas as situações é possível encontrar um motivo para sorrir, à Marcela, Bea, Jéssica e Ju, pela amizade, conversas e festinhas. Muito obrigada a todos por todas as noites e madrugadas de estudo, por todos os cafés da tarde que alegravam uma semana difícil na faculdade, por todos os almoços de domingo que fazíamos como uma família, por todas as risadas que demos juntos, pelas lágrimas que enxugaram quando eu me sentia esgotada, pelas festinhas à fantasia, e por me ajudarem concluir essa graduação, sem vocês não seria possível. Amo vocês!

Às minhas irmãs de coração, Clara e Ana, pelos 18 anos de amizade, por estarmos juntas nos momentos mais importantes das nossas vidas, sempre me apoiarem, aconselharem, por sempre querer o melhor para mim como eu quero para vocês. Obrigada pela nossa amizade única, indestrutível, e pela confiança que temos entre nós. Amo vocês!

Agradeço mais uma vez ao Murilo pela ajuda de sempre no laboratório e na vida, pelo companheirismo nesse caminho que percorri, pelas conversas, abraços, planejamentos conselhos, carinho, amor, por fazer tudo por mim e sempre me fazer mais feliz. Obrigada por me dar uma família incrível como a sua pra fazer parte. Amo você!

À minha família, que me tornou quem eu sou hoje. Agradeço imensamente os meus pais, Rogério e Márcia, por me ensinarem as coisas mais valiosas da vida, por estarem sempre comigo, por sempre me apoiarem e motivarem, por todo amor, cuidado, carinho, e energia positiva que me mandam todos os dias, e que apesar de todas as dificuldades sempre me

proporcionaram o melhor de tudo. À minha irmã, minha maior companheira, que me entende e conhece melhor que qualquer um nessa vida. Temos uma conexão que sempre nos surpreende, porque sabemos quando uma precisa da outra e a gente sempre se ajuda, muito obrigada por tudo! Pai, mãe, Lari, vocês me ajudaram passar por essa jornada e se um dia eu puder retribuir tudo o que fizeram por mim eu estarei realizada! Amo vocês!

A todos os meus familiares que estiveram presentes e me ajudaram a concluir essa etapa. Ao meu avô, Domingos (em memória), pelo orgulho que sei que sentiria de mim. Aos meus tios Andréa e Ricardo pelas caronas oferecidas, e às minhas primas Camila, Milena, Mirela e Rafaela pelas maratonas de séries, caminhadas de domingo e pela alegria que vocês me proporcionam. Um agradecimento especial à minha vóinha Ângela e minha tia Raquel, que sempre me deram abrigo, amor, carinho e motivação quando precisei, que nos finais de semana difíceis estiveram comigo para me mostrar que não podemos viver a vida pelos outros, e que com o tempo tudo passa. Amo vocês!

Este agradecimento não faz jus à minha eterna gratidão para com todos que me apoiaram e me auxiliaram, e contribuíram de alguma forma para a minha formação como bióloga e como pessoa. Muito obrigada a todos!

*“O fardo é proporcional às forças, como a recompensa
será proporcional à resignação e à coragem.”*

(Allan Kardec)

Resumo

Venenos de vespas, abelhas e formigas constituem a principal fonte causadora de respostas alérgicas sistêmicas, com grande risco de choque anafilático nas situações de ferroadas por estes insetos. A vespa *Polybia paulista*, conhecida popularmente como “paulistinha”, dentre as muitas espécies de vespas sociais do Brasil, é abundante na região Sudeste brasileira principalmente no estado de São Paulo e sul de Minas Gerais, sendo de grande importância médica nessa região. O veneno desse inseto possui várias proteínas que podem atuar como alérgenos, sendo as principais a hialuronidase, a fosfolipase A1 e o antígeno 5. Os resultados majoritariamente positivos de estudos imunológicos recentes com essas proteínas têm impulsionado o aumento de pesquisas na área, com novos ensaios que podem ajudar na caracterização molecular desses alérgenos e no entendimento de processos alérgicos. Dentre os 3 alérgenos supracitados, o antígeno 5 (Ag5, ou Poly p 5 especificamente no caso de *P. paulista*) é o mais abundante, sendo considerado o composto mais alergênico deste veneno. Pode ser produzido de forma recombinante com uso da levedura *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), com a vantagem de obtenção em alta quantidade da proteína de interesse e expressão muito baixa de outras proteínas endógenas contaminantes. Este processo viabilizou a realização de importantes análises sobre o uso potencial do Ag5 recombinante (ryPoly p 5), molécula homóloga ao antígeno 5 natural presente em *P. paulista*, em testes diagnósticos alérgico-específicos. Para isso, soros de pacientes alérgicos aos venenos dessa vespa, bem como ao veneno de outros insetos da ordem Himenóptera, foram testados por meio da imunodeteção com anticorpo anti-IgE humano. Os resultados mostraram que a maioria dos soros testados reconheceram indistintamente o alérgeno, o que indica que pacientes alérgicos ao veneno de abelhas e formigas puderam reconhecer o ryPoly p 5 devido à presença de componentes homólogos em seus venenos, sendo eles a Apidaecina e Sol 3, respectivamente. Um número maior de soros precisa ser analisado para que estes resultados sejam aprimorados de forma a contribuir na seleção de alérgenos no desenvolvimento de kit(s) diagnóstico(s) de alergias provocadas pelo veneno de *P. paulista*.

Palavras chave: Antígeno 5, Resposta imunológica, *Polybia paulista*.

Sumário

1. Introdução	9
2. Objetivo	12
3. Metodologia.....	13
3.1 Coleta de ninhos de <i>Polybia paulista</i> e preparo e análise do extrato de veneno bruto ..	13
3.2 Expressão da ryPoly p 5 em <i>Komagataella phaffii</i> (<i>P. pastoris</i>)	14
3.3 Purificação da proteína alergênica ryPoly p 5	15
3.4 Análise de Western Blot com soro de pacientes.....	17
4. Resultados e discussão.....	19
4.1 Coleta de ninhos de <i>Polybia paulista</i> e preparo e análise de extrato de veneno bruto...	19
4.2 Expressão da ryPoly p 5 em <i>Komagataella phaffii</i> (<i>P. pastoris</i>)	20
4.3 Purificação da proteína alergênica ryPoly p 5	22
4.4 Análise de Western Blot com soro de pacientes.....	24
5. Conclusão	28
6. Referências	29

1. Introdução

A ordem Hymenoptera é uma das principais ordens entre os insetos, com mais de 153 mil espécies descritas, dentre elas estão as vespas, abelhas e formigas (PETERS et al., 2017). Só no Brasil, mais de 320 espécies de vespas foram descritas, o que representa 33% das vespas já descritas no mundo (LOCHER, 2014). É dentro dessa ordem que a vespa social *Polybia paulista*, da família Vespidae, faz parte. Até recentemente, essa vespa foi considerada endêmica do sudeste do Brasil, principalmente no estado de São Paulo, razão pela qual é chamada popularmente de “paulistinha”, e é nessa região, uma das principais causadoras de acidentes com ferroadas de insetos (PALMA, 2006). Porém, pesquisas recentes comprovaram ocorrência dessa espécie de vespa em outras regiões brasileiras, como Piauí, Ceará (SOMAVILLA et al., 2017) e Mato Grosso do Sul (PEREIRA-BOMFIM, 2014), além de também ter sido descrita em outros países da América Latina, como Argentina e Paraguai.

O veneno das vespas é uma mistura complexa de amins biogênicas, peptídeos e proteínas sintetizados como moléculas precursoras. A vespa social *P. paulista* apresenta seu veneno estruturado de forma similar ao da maioria das Himenópteras sociais, se constituindo de amins biogênicas, peptídeos básicos e proteínas de elevada massa molecular, e dentre estas últimas as principais são os alérgenos Hialuronidase (Hyal), Fosfolipase (PLA1) e Antígeno 5 (Ag5), que se destacam por serem os compostos mais abundantes (JUSTO JACOMINI et al., 2014) Eles têm a capacidade de induzir o sistema imune a produzir anticorpos com alta especificidade, e desencadear reações alérgicas em pacientes sensibilizados, podendo comprometer o sistema respiratório e circulatório (AALBERSE, 2000). Juntamente com os peptídeos ativos, as proteínas alergênicas são responsáveis por essas respostas sistêmicas, bem como pela apresentação de edema, eritema, e dor prolongada quando ocorre a ferroada (JUSTO JACOMINI et al., 2014).

Dentre os principais alérgenos presentes no veneno de *P. paulista*, a Hyal e a PLA1 já foram caracterizadas tiveram suas funções determinadas. A primeira é uma glicoproteína de 45kDa com função de hidrolisar o ácido hialurônico, um polissacarídeo de elevada massa molecular que mantém a adesão da parede celular das células, dessa maneira ela possibilita a diminuição da sua viscosidade e proporciona melhor difusão do veneno para o interior das células. A segunda é uma enzima responsável pela hidrólise dos fosfolipídeos da membrana plasmática celular, permitindo a difusão das toxinas do veneno para as células, e após a ferroada é a PLA1 promove a formação do edema (CASTRO et al., 2009).

O Antígeno5 (Ag5), por sua vez, é o terceiro principal alérgeno citado, e apesar de sua função biológica ainda ser desconhecida (KING et al., 1990), sua alergenicidade é

comprovada por muitos estudos, e vem sendo considerado como o componente mais alergênico do veneno de vespas, superando as demais enzimas (NAKAJIMA, 1986). Proteínas muito semelhantes estruturalmente ao Ag5 também estão presentes em diversos outros sistemas de seres vivos. O Ag5, de aproximadamente 23kDa, faz parte de um clado de proteínas secretoras ricas em resíduos de cisteína, e parte de uma superfamília denominada CAP. Segundo Gibbs (2008) e colaboradores, há fortes evidências de que as proteínas dessa superfamília têm papéis importantes na biologia de mamíferos, envolvendo função reprodutiva, imunologia e controle e desenvolvimento de câncer e doenças crônicas. A expressão recombinante do Ag5 proporciona uma maior disponibilidade desse alérgeno, podendo ser utilizado em diversas situações e também aumentar o detalhamento de sua caracterização.

Histórico médico de reação sistêmica a ferroadas, teste cutâneo e detecção de anticorpos específicos ao veneno compreendem o diagnóstico de alergia, mas apresentam algumas limitações devido a não identificação correta do inseto responsável pela ferroadada (OLLERT, BLANK, 2015; BAZON, 2017).

Os alérgenos nativos de baixa abundância são geralmente difíceis de serem isolados em quantidades substanciais. Mesmo a purificação dos alérgenos de maior abundância e sua utilização posterior para o diagnóstico tem várias desvantagens, tais como, a presença (nos próprio componentes) de determinantes de carboidratos com reatividade cruzada (CCDs) e a contaminação com outros componentes alergênicos, ambos os quais podem comprometer e até falsear positiva ou negativamente as análises de diagnóstico em nível molecular. Por outro lado, a maior disponibilidade destes alérgenos, quando na forma recombinante, pode ser considerada um pré-requisito para a sua caracterização, e sua utilização em diversas aplicações (MONSALVE et al, 2012; OLLERT, BLANK, 2015). É fato conhecido que quando utilizamos a levedura *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) na expressão de proteínas recombinantes ocorre um padrão de glicosilação diferente do que ocorre nos seres humanos. Apesar disso, a aplicação de tal metodologia apresenta muitas vantagens, como a alta produtividade da proteína de interesse em contraste com a baixa produção de proteínas intrínsecas dessa levedura, crescimento rápido e em alta densidade celular, linhagens recombinantes mais estáveis, secreção mais eficiente e processamento pós-traducional mais similar ao de mamíferos (DEMAIN, VAISHNAV, 2009). Além disso, existe o fato de o Ag5 recombinante do veneno de *P. paulista* - ryPoly p 5 - não apresentar CCDs quando é expresso de forma heteróloga (BLANK, 2013; PEREZ-RIVEROL et al., 2018), que é mais uma vantagem devido a inexistência de risco de resposta falso-positiva em análises moleculares pela presença desses compostos.

Estudos epidemiológicos estimam que aproximadamente de 56% a 94% das pessoas já sofreram acidentes com ferroadas de himenópteras ao menos 1 vez na vida, devido a convivência próxima nos ambientes urbanos, e à elevada agressividade desses insetos (ANTONICELLI et al., 2002). A vespa em questão nesse trabalho, a *P. paulista*, tal como os insetos seu grupo, é muito agressiva e desenvolveu hábitos urbanos devido ao desmatamento de florestas e destruição de seu habitat natural. É considerada de grande importância médica (AGUIAR, 2006) pois ocorrem muitos acidentes por suas ferroadas, os quais podem levar a sérias reações alérgicas (JUSTO- JACOMINI, 2013; PALMA, 2006). Estima-se que 25% das pessoas do mundo sofrem algum tipo de alergia, sendo de 9,3% a 28,5% causada por veneno dos himenópteros sociais (ANTONICELLI et al., 2002). Apesar da abundância de espécies de insetos, ainda não existem extratos alérgênicos para o diagnóstico e tratamento de pacientes alérgicos no Brasil. A habilidade de produzir formas recombinantes do alérgeno Ag5 e de realizar estudos funcionais comparativos sobre o potencial imunogênico deste alérgeno em ambas as formas (recombinante *versus* natural) abre possibilidades para melhoria e eficácia de diagnóstico de alergia. Portanto, esta pesquisa visou contribuir com os avanços para a acuracidade no diagnóstico, bem como no desenvolvimento de kit(s) de diagnóstico de alergias provocadas pelo veneno de *P. paulista* e de outros insetos da ordem Hymenoptera existentes no Brasil.

2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar, por meio da técnica de Western Blot, se o IgE presente em soros de pacientes sensibilizados ao veneno de diferentes espécies de Hymenoptera – *Solenopsis*, *Apis mellifera*, e *Polybia paulista* – seria ou não capaz de reconhecer imunologicamente o alérgeno Antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista* expresso na forma recombinante (ryPoly p 5) em levedura *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), implicando assim e respectivamente, na sua potencialidade de ser utilizado no diagnóstico de alergia ao veneno, resolvido por componente (Component Resolved Diagnostics – CRD).

3. Metodologia

As atividades deste trabalho foram realizadas tanto no Instituto de Biociências do Campus da UNESP de Rio Claro – SP - Brasil, Depto. de Biologia, no Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes – (LBMA), bem como no Laboratório de Alergia e Imunologia Translacional (LIT) da Faculdade Medicina (FCM), Depto. de Clínica Médica, UNICAMP – Campinas – Brasil, sob a coordenação do Prof. Dr. Ricarado de Lima Zollner e a colaboração do Prof. Dr. Luís Gustavo Romani Fernandes e da Mestranda Débora Moitinho Abram.

3.1 Coleta de ninhos de *Polybia paulista* e preparo e análise do extrato de veneno bruto

Após identificação morfológica, foram feitas coletas de ninhos de *Polybia paulista* no campus de Rio Claro, UNESP e na cidade de Rio Claro, SP, Brasil, com práticas de medidas de segurança necessárias, tais como a roupa de proteção adequada e acompanhamento de supervisor experiente em coletas de ninhos de insetos. Após a coleta dos ninhos, estes foram encaminhados ao LBMA, onde foram armazenados a temperatura de -80°C, por no mínimo 2 horas antes de realocar as vespas em outro recipiente. Só então, foi possível a dissecação de suas glândulas de veneno com auxílio de pinças entomológicas, as quais foram imediatamente armazenadas a temperatura de -20°C, em solução aquosa (água Milli-Q) gelada, contendo 1mM final de PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*, Sigma-Aldrich) numa proporção de 1:1, (glândulas de veneno:solução).

Para o preparo dos extratos de veneno bruto, foi feita maceração das glândulas de veneno de *P. paulista* contidas em 4 tubos *ependorf*, utilizando-se para isto, leve pressão sobre as glândulas por meio de pistilos de plástico adaptáveis aos tubos, os quais foram sempre mantidos em gelo. Logo em seguida, eles foram centrifugados a 14.000xg, 10 minutos a 4°C, descartando-se os precipitados e retirando-se o sobrenadante rico em proteínas do veneno. Os sobrenadantes de cada um dos 4 tubos foram reunidos em 1 único tubo *ependorf*. A análise qualitativa das proteínas presentes no extrato bruto de veneno foi realizada por meio de eletroforese de proteínas. Para isto, foram preparados géis de poliacrilamida a 12%, sob condições denaturantes – sistema alcalino Tris-Glicina/Tris-HCl na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com base no protocolo de Laemmli (1970). As amostras foram diluídas em tampão 4x concentrado, contendo DTT 0,3M fervidas por 5 minutos, e após resfriamento, foram aplicadas nas canaletas dos géis, ao lado de um padrão de massa molecular de proteínas (padrão pré-corado – High-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences – GE Healthcare, USA, ou o padrão sem coloração Dalton

Mark 6, Sigma Chemical Co.), sendo a corrida efetuada em cerca de 100-150volts. Após corrida, os géis foram corados com solução aquosa de metanol 45%, (v/v), ácido acético 10%, (v/v) e Coomassie Blue R-250 0,1%, durante no mínimo 2 horas a temperatura ambiente ou *overnight*, e em seguida descorados com solução aquosa de metanol 30%, (v/v), e ácido acético 10%, (v/v), trocando-se a solução descorante a cada 15 minutos por 2 a 3 horas, até ser possível visualizar as bandas proteicas. Quando a visualização de bandas era dificultada pela baixa quantidade de proteínas nos géis, foi utilizada a coloração com prata, de acordo com método de Blum et al. (1987).

A dosagem de proteínas totais nos extratos de veneno bruto foi realizada pelo método de Bradford modificado, sendo utilizada albumina de soro bovino (Sigma, EUA) como padrão (SEDMAK, GROSSBERG, 1977).

3.2 Expressão da ryPoly p 5 em *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*)

Para a expressão da proteína ryPoly p 5, células da levedura *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*) X-33/pPICZ α A-Ag5 (vetor contendo o inserto Ag5) foram crescidas em placas de Petri contendo meio YPD-ágar – Yeast Extract Peptone Dextrose (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, dextrose (glicose) a 2 %, ágar a 2% e zeocina a 100 μ g/mL), a 28 °C durante 3-4 dias. Uma colônia de levedura isolada da placa foi selecionada para preparação do pré-inóculo, a qual foi crescida durante a noite (17 a 20 horas, a 28°C com agitação de 250 rpm), em 25mL do meio BMGY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, 100 mM do tampão KPO₄ pH 6,0, YNB a 1.34%, biotina a 4x10⁻⁵% e glicerol a 1%) em frasco *Erlenmeyer* de 250 mL (tampado com poucas camadas de gaze para proporcionar grande oxigenação ao sistema).

Após 17 a 20 horas do início do crescimento do pré-inóculo, foram recolhidas alíquotas, que foram diluídas de 1 a 100x para medição da DO_{600nm} em água não estéril. Ao atingir valores de DO_{600nm} entre 0,3 e 0,5, um volume de células do pré-inóculo para dar um DO_{600nm} =1,0 final no inóculo, foram recolhidas por centrifugação a 3.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo que o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas 2 vezes em 25 mL de H₂O estéril. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 100 mL de meio BMMY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, tampão KPO₄ pH 6,0 a 100 mM, YNB a 1.34%, biotina a 4x10⁻⁵%, metanol a 1%) em frasco *Erlenmeyer* aletado de 1000 mL. Uma alíquota inicial de 2 mL foi coletada, sendo correspondente ao tempo “zero hora” (T₀) do inóculo. Logo a seguir, foi iniciada a indução da expressão da proteína ryPoly p 5 pela adição do indutor – metanol a 1% final. Um clone de *K. phaffii* (*P. pastoris*) transformado com o vetor pPICZ α A vazio foi utilizado como controle negativo, seguindo os mesmos

procedimentos de indução. Às culturas foi adicionado indutor a cada 24h, durante 3 dias, incubando a cultura a 28°C e sob agitação de 250 rpm, sempre sendo coletada alíquotas de 2mL antes de cada adição do indutor (T₂₄, T₄₈, T₇₂), as quais foram sempre centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos, descartando os precipitados e recolhendo os sobrenadantes. Todas as alíquotas, coletadas nos diferentes tempos, foram congeladas (-20°C) para análise de expressão por eletroforese (SDS-PAGE) após o final da indução. Além das alíquotas de 2 mL foram coletadas também amostras de 100µL para a leitura imediata da DO_{600nm} em diluições seriadas em água não estéril, para acompanhar o crescimento da cultura. Após as 72h, as culturas foram centrifugadas (3.000 x g por 5 minutos) em tubos Falcon de 50mL e seus sobrenadantes recolhidos para análise da expressão em SDS-PAGE 12%, para dar início ao processo de purificação da proteína expressa.

Antes da etapa de purificação, foi feita análise em gel SDS-PAGE 12% de cada alíquota coletada a cada 24 horas, para confirmar a expressão da proteína. De cada alíquota foi utilizado 1 mL e adicionado ¼ do volume (250µL) de TCA 100% (ácido tricloroacético) gelado, que foram incubados a 4°C por no mínimo 2 horas ou durante a noite. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 30 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados, contendo as proteínas totais da alíquota de 1mL, foram lavados 2 vezes, com acetona 100% gelada, por centrifugação a 12.000 xg, a 4°C, 15 minutos. Ao final, centrifugou-se uma terceira vez e os tubos foram deixados deitados e abertos, em capela de exaustão, para evaporação completa da acetona. Em seguida, os precipitados proteicos foram ressuspensos em tampão de amostra 1x concentrado, contendo DTT 0,15M, fervidas por 5 minutos, e após resfriamento, foram aplicadas nas canaletas de géis SDS-PAGE a 12%, assim como um dos padrões de massa molecular descritos no Item 3.1, para então iniciar a corrida. Ao término desse processo, os géis foram corados e descorados como também descrito no mesmo Item 3.1.

3.3 Purificação da proteína alergênica ryPoly p 5

Para a purificação, a fim da remoção das proteínas contaminantes (expressas normalmente por *P. pastoris*), a amostra contendo o ryPoly p 5 passou por filtrações sequenciais em membranas (47 mm de diâmetro) de filtração PES (polietersulfona) de poro 0,45 µm, seguida pela de 0,22 µm. Posteriormente, utilizando filtros Amicon (Ultra-15 Centrifugal Filter Units) de 10 kDa, a amostra foi concentrada e ressuspensa em tampão fosfato de sódio 20mM (Na/PO₄, pH 7,4), contendo 0,5 M NaCl e 20mM de imidazol. Logo depois, foi realizada purificação em coluna HisTrap™HP de 5 ml por cromatografia de

afinidade em resina de Ni^{2+} (Ni-NTA-Agarose) seguindo o protocolo do fabricante (Protocol 14, The QIAexpressionist, Qiagen, Germany). Uma representação ilustrativa do Amicon e da Coluna HisTrap podem ser observados na Figura 1 (A, B). Nessa etapa de purificação com coluna “His-tag” de 5 mL, foram utilizados respectivamente, cerca de 10x o volume da coluna de água Milli-Q para lavagem inicial, e 5x o volume da coluna de tampão de ligação (Na/PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M e de Imidazol 20 mM). Após o equilíbrio da coluna com tampão de ligação, a amostra de ryPoly p 5 (10 a 15 mL) também diluída em tampão fosfato de sódio contendo 20mM Imidazol foi aplicada à coluna. A seguir, foi feita uma lavagem da coluna com 50 mL (10x seu volume) de tampão 50 mM (Na/PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M e contendo Imidazol 50 mM) para desligar as proteínas não ligadas ou ligadas inespecificamente à resina e finalmente a eluição com 25ml (5x seu volume) de tampão de eluição contendo 75 mM de Imidazol (Na/PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M e de Imidazol 75 mM).

Da purificação da proteína expressa em minicoluna de “His-tag”, resultaram entre 10 a 15 mL de ry Poly p 5 em frações eluídas desta coluna, distribuídas em tubos *ependorff* de 2 mL. Todas estas frações foram analisadas por SDS- PAGE a 12%, sendo que as frações que apresentaram ryPoly p 5 expressa (visualizado por SDS- PAGE) em maior quantidade foram coletadas, agrupadas e liofilizadas e tiveram sua concentração de proteínas totais determinada pelo método de Sedmak e Grossberg (1977), como descrito acima.

Figura 1A, B. (A) Coluna HisTrap™ de 5 ml utilizada na purificação do ryPoly p 5. (B). Amicon (Ultra-15 Centrifugal Filter Units) de 10 kDa.



Fonte: GE Healthcare Life



Fonte: Thermo Fischer Scientific

3.4 Análise de Western Blot com soro de pacientes

Os soros utilizados fazem parte do Banco de Dados do Laboratório de Imunologia Translacional (LIT) do departamento de Clínica Médica, FCM – UNICAMP, do Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner e foram coletados em 2006 sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da FCM-UNICAMP sob o N° 187/2006. O grupo citado e o da UNESP estão em colaboração desde 2009.

A seleção dos soros de pacientes alérgicos aos venenos de insetos Himenópteros, incluindo *Polybia paulista*, foi realizada por meio de análises de ELISA (*Enzyme linked ImmunoSorbent Assay*), o qual é baseado em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas (teste imunoenzimático). Do acervo de soros de pacientes do LIT cedidos pelo Ricardo de Lima Zollner, foram selecionados 4 soros de pacientes alérgicos unicamente a abelha (*Apis mellífera*), 4 soros de pacientes alérgicos somente a formiga (*Solenopsis invicta*) e 3 soros de pacientes alérgicos somente a vespa (*P. paulista*) para esta análise. Após a seleção e agrupamento dos soros todos, estes foram analisados quanto a reação de IgE ao alérgeno ryPoly p 5 em comparação com a reação de IgE específica presente nos soros dos pacientes alérgicos ao veneno de *P. paulista*, utilizando o extrato bruto desta vespa.

À amostra purificada de ryPoly p 5 obtida da expressão em levedura foi adicionado tampão de amostra com β -mercaptoetanol (β -ME) na proporção 1:20, e foi submetida, após fervura por 5 minutos e resfriamento, à corrida ao lado do padrão de massa molecular de proteínas pré-corado (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Fermentas Life Sciences) em gel (1,55mm de espessura) de gradiente de 10% - 20%, sob condições denaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sendo a voltagem aplicada 25V no início do gel e a 75V no restante, por aproximadamente 2 horas. Após isso, o gel com a proteína, a membrana de nitrocelulose de 0,22 mm e os papéis de filtro foram submergidos em tampão de transferência, e em seguida foi feita a transferência do gel para membrana por 40 minutos, utilizando um sistema semi-seco (TransBlot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, EUA). A eficiência da transferência das proteínas dos géis para as membranas foi avaliada pela coloração dos géis com Coomassie Blue G-250 (Sigma, EUA), e também com prata pelo método de Blum et al. (1987).

Em paralelo, as membranas contendo as proteínas transferidas foram submetidas a um procedimento de bloqueio por 2 horas, a temperatura ambiente sob agitação lenta, utilizando o tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, Tween-20 a 0,5% (solução de lavagem TBS-T, Sigma Aldrich, EUA), e 3% de leite desnatado. Seguindo o bloqueio, a membrana foi

lavada 3 vezes com TBS-T, e após ser cortada em tiras manualmente com auxílio de estilete e pinça para evitar qualquer contato diminuindo risco de danificar e contaminar a membrana, elas são transferidas para um sistema de canaletas que permite o seu isolamento. Às tiras recortadas da membrana, foram adicionados os soros contendo o anticorpo primário IgE diluído na proporção de 1:50 em TBS-T, na ordem citada acima. O sistema contendo as tiras da membrana submersas nas amostras de soro foi incubado durante a noite à temperatura ambiente sob agitação lenta num misturador de plataforma Rocker II TM.

No dia seguinte os soros foram retirados de cada canaleta e cada tira da membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T, para então ser realizada a imunodeteção, adicionando o anticorpo secundário anti-IgE humana conjugado com peroxidase (Sigma & Aldrich, EUA) diluído a 1: 3000 (TBS-T e 0,3% de leite desnatado) e deixando incubando por 2 horas. Ao término desta etapa, foram feitas mais 3 lavagens com TBS-T, e então foi realizada adição do substrato quimioluminescente LuminataTM Forte Western HRP substrate (Millipore, USA) por 5 minutos em local isento de qualquer claridade. Após retirar o excesso desta substância da membrana, foi feita a revelação e visualização das bandas no aparelho fotodocumentador Image Quant 400 (GE Healthcare, Suécia).

4. Resultados e discussão

A utilização de veneno bruto de insetos Himenóptera para o diagnóstico de alergia tem-se mostrado ineficiente devido (a) à dificuldade muitas vezes encontrada para a identificação e coleta de insetos, preparação e análise dos extratos brutos de veneno; (b) às ocorrências de reatividade cruzada entre os alérgenos de veneno, que compartilham sequências de aminoácidos similares (epítomos) os quais são reconhecidos pelos anticorpos IgE, presentes em indivíduos alérgicos; (c) a possíveis reações imunológicas adversas com outros alérgenos presentes nos venenos, além daquele(s) a que os pacientes apresentavam reação anteriormente. Por outro lado, a utilização de alérgenos recombinantes tem se mostrado eficiente na resolução de pelo menos duas destas questões - (a) e (c) -, sendo que a reatividade cruzada ainda tem sido objeto de vários estudos, incluindo a utilização de conjuntos de alérgenos recombinantes (denominados painéis de alérgenos) previamente caracterizados.

4.1 Coleta de ninhos de *Polybia paulista* e preparo e análise de extrato de veneno bruto

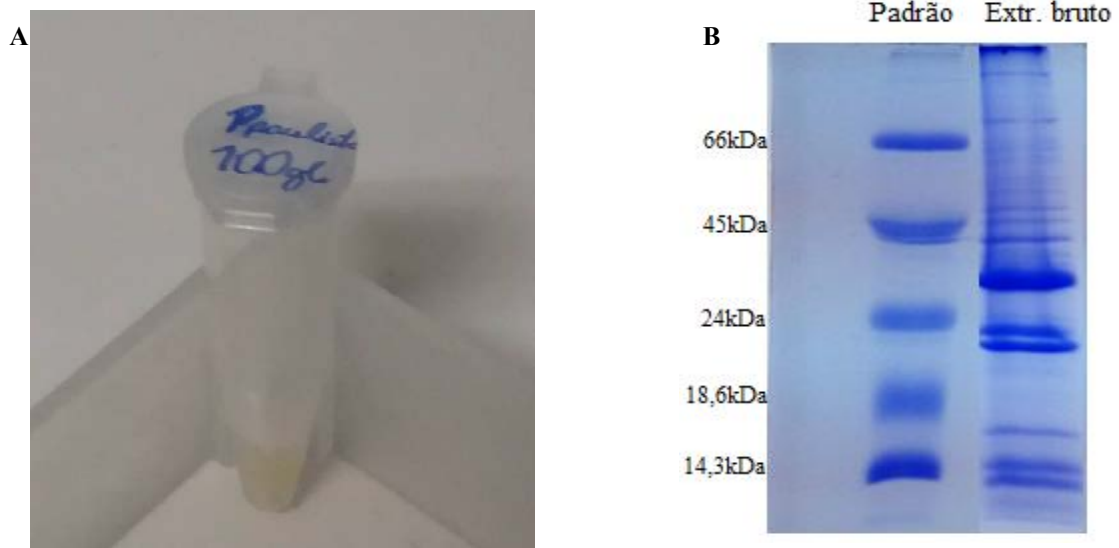
Após criteriosa identificação dos indivíduos de interesse (Figura 2), coletas dos ninhos de *P. paulista* e dissecação de suas glândulas de veneno, os extratos brutos foram preparados na presença do inibidor de proteases - PMSF, conforme mencionado em Metodologia Item 3 (Figura 3A) a fim de prevenir a degradação de proteínas. Os extratos de veneno preparados, foram submetidos à quantificação das proteínas totais pelo método modificado de Bradford, e analisados por análise de SDS-PAGE 12% (Figura 3B).

Figura 2. Imagem de indivíduo de vespa *Polybia paulista*.



Fonte: Prof. Mario Palma/Sao Paulo State University

Figura 3A, B. (A) Glândulas de veneno armazenadas em PMSF 1mM a -20C, para preparo de extrato de veneno bruto. (B) Análise de SDS-PAGE a 12% do extrato de veneno bruto.



4.2 Expressão da ryPoly p 5 em *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*)

Conforme descrito em no item 3.2, foram crescidas placas, com meio de cultura YPD-água contendo as células X-33/pPICZ α - Poly p 5 (Figura 4). Para chegar a um crescimento adequado das colônias, como mostrado nessa figura, o tempo de incubação das placas variou de 3 a 4 dias. As colônias também puderam ser crescidas a 30°C para acelerar o crescimento para 3 dias sem problemas.

Figura 4. Placa contendo colônias de X-33/pPICZ α -Poly p 5 em meio YPD + Zeocina.

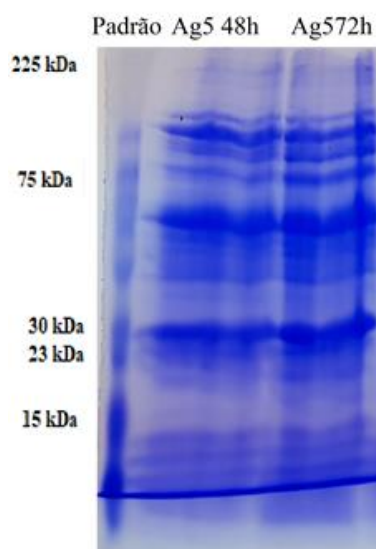


Conforme descrito na Metodologia, o processo da expressão foi iniciado após seleção de uma única colônia isolada da placa e incubação da pré-cultura de levedura em meio BMGY, o qual possui glicerol como única fonte de energia. Estas condições permitem que a levedura cresça de modo ideal, sem que ocorra qualquer ativação do cassete de genes, onde foi clonado o gene heterólogo da proteína ryPoly p 5. A fase exponencial do crescimento acontece quando a medida a DO_{600nm} da cultura atinge valores ao redor de 6, o que pode ser medido por leitura de alíquotas da cultura diluídas de 20 a 100x em água não estéril. Ao atingir este valor de DO, é calculado o volume/quantidade de células que devem ser utilizadas do pré-inóculo, para que tenha sempre uma DO_{600nm} inicial=1,0 (equivalente a $\sim 5 \times 10^7$ células/mL) de forma a dar início à cultura (inóculo) de indução com metanol, em meio BMMY. Somente neste meio e em presença do metanol é que o gene heterólogo passa a ser induzido e expresso. Desta forma, antes de ser adicionado o indutor metanol a 1% a cada 24 horas foi feito acompanhamento do crescimento e de expressão da proteína recombinante de interesse do estudo. Os valores obtidos para um destes experimentos podem ser observados na Tabela 1. Com as mesmas alíquotas não diluídas e já processadas foi possível fazer análise de eletroforese (Figura 5) para o mesmo fim, de avaliar expressão do antígeno 5 recombinante. Pode-se observar nesta Figura, que a amostra retirada do tempo de 72 horas foi a que apresentou o melhor o nível de expressão do alérgeno de interesse, com massa molecular em torno de 23 kDa, pela presença de uma banda mais robusta e compacta.

Tabela 1. Análise da expressão da proteína ryPoly p 5 por valores obtidos (em $\mu g/\mu l$) ao se medir densidade óptica em 600nm de amostras da cultura colhidas a cada 24 horas durante a incubação.

Tempo de incubação (h) da cultura de ryPoly p 5 em meio BMMY	DO_{600nm} (alíquotas retiradas da cultura antes da adição do indutor)
T ₀	0,634
T ₂₄	1,662
T ₄₈	18,8
T ₇₂	19,9

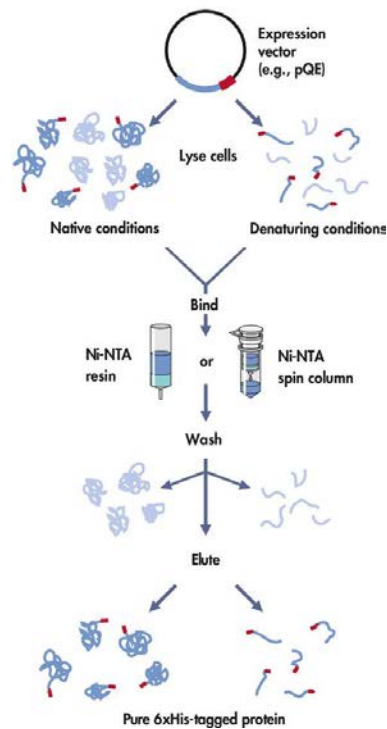
Figura 5. Análise de SDS-PAGE a 12% de amostras da expressão de ryPoly p 5 em *Komagataella phaffi* à 28°C por 72 horas. **Padrão:** padrão de massa molecular (High-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences-GE Healthcare, USA), **Ag5 48h:** amostra de expressão de ryPoly p 5 no tempo 48 horas, **Ag5 72h:** amostra de expressão de ryPoly p 5 no tempo 72 horas.



4.3 Purificação da proteína alergênica ryPoly p 5

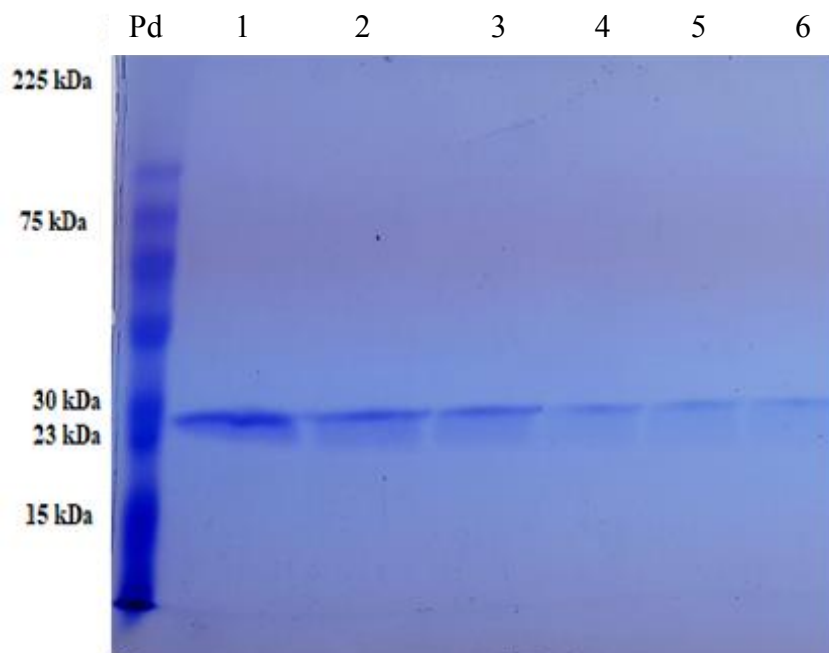
Após ter sido filtrada em membranas de polietersulfona (PES) de diferentes porosidades para remoção de resíduos celulares (0,45 μ m e 0,22 μ m respectivamente), a amostra de ryPoly p 5 de 72 horas foi concentrada em tampão fosfato por meio de filtros Amicon de 10 kDa e então submetida à purificação em coluna de afinidade de Ni-NTA-Agarose (His-Trap Ni⁺²), conforme descrito em Metodologia. Neste procedimento de purificação, a molécula de Ni⁺² acoplada à resina da coluna interage especificamente com as moléculas de Histidina presentes na cauda da proteína recombinante expressa. Por outro lado, a mistura de proteínas e outras moléculas presentes na amostra somente interagem de forma inespecífica com a resina, podendo ser facilmente retiradas da coluna por sucessivas lavagens com tampões contendo diferentes concentrações de Imidazol, o qual, devido a sua semelhança de estrutura com a Histidina, se liga da mesma forma ao átomo de Ni⁺² e, portanto, compete com as moléculas de Histidina pela ligação com a resina. Desta forma, o tampão com a maior concentração de Imidazol capaz de deslocar o alérgeno recombinante ryPoly p 5 que havia ficado preso à resina da coluna foi de 75mM, conforme já havia sido observado por Bazon e colaboradores (2017). Essa reação pode ser exemplificada no esquema exibido na Figura 6. A análise de eletroforese por SDS-PAGE 12% dessas amostras, para avaliar a eficácia da purificação, pode ser visto na Figura 7.

Figura 6. Esquema ilustrativo da purificação de proteínas com o Sistema de Purificação de Proteínas Ni-NTA.



Fonte: GE Healthcare LifeSciences

Figura 7. Análise de SDS-PAGE a 12% de amostras purificadas em coluna His-Trap Ni⁺² por cromatografia de afinidade, contendo maior concentração de ryPoly p 5, o que pode ser observado pela intensidade das bandas no gel. **Pd**: padrão de massa molecular (High-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences-GE Healthcare, USA), **1 a 6**: Amostras de ryPoly p 5 das frações eluídas em tampão de eluição 75 mM. de Imidazol (Na₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M e Imidazol 75 mM).



4.4 Análise de Western Blot com soro de pacientes

A análise de imunodeteção por Western Blot com soro de pacientes foi realizada no Laboratório de Imunologia Translacional (LIT) do Departamento de Clínica Médica, FCM – UNICAMP, em Campinas, SP, Brasil, sob coordenação do Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, e auxílio técnico da Mestranda Débora Moitinho Abram.

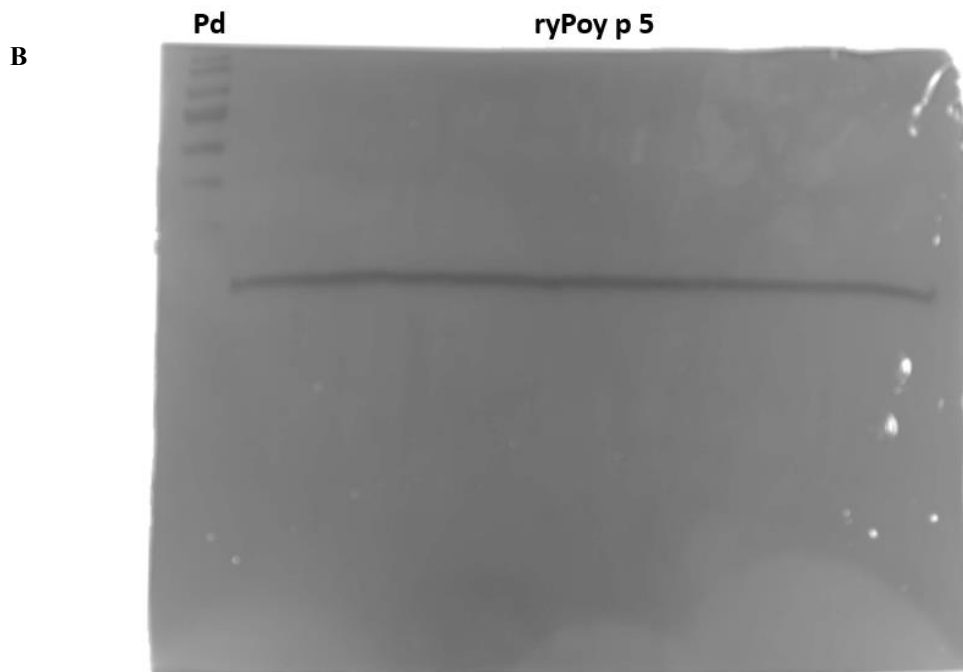
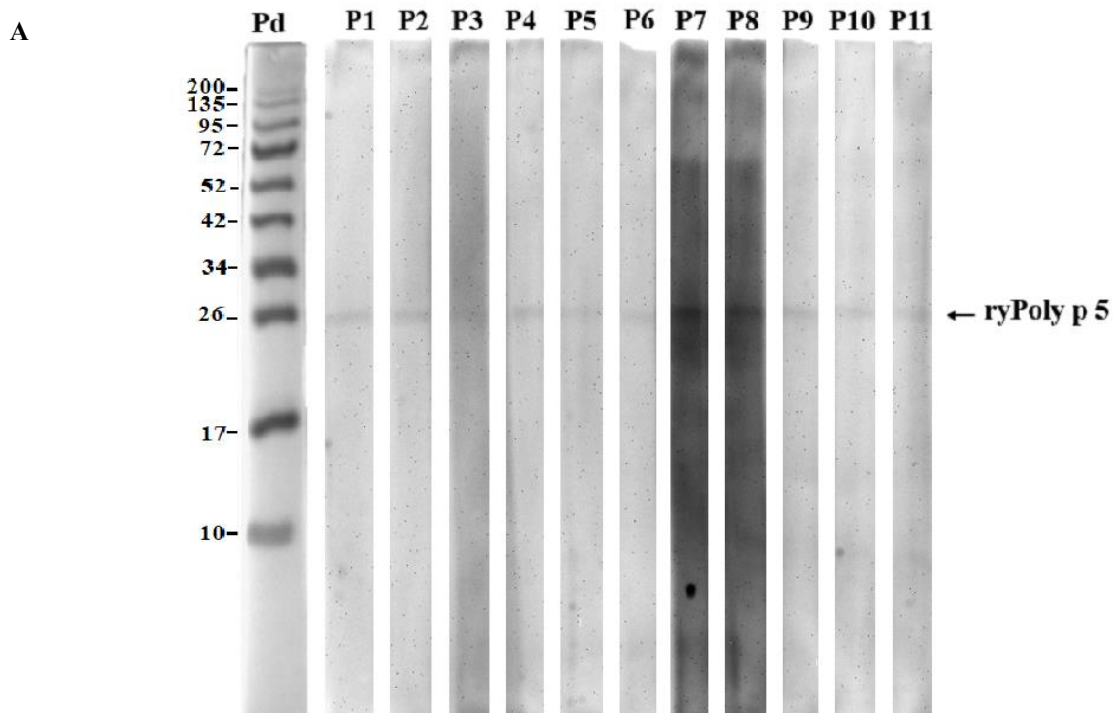
Os 11 soros utilizados nesse estudo, sendo 3 de pacientes alérgicos a *P. paulista*, 4 de pacientes alérgicos a *A. melífera* e os últimos 4 de pacientes alérgicos a *Solenopsis*, foram selecionados de acordo com os níveis de detecção dos ensaios ELISA, nos quais os soros dos pacientes alérgicos a abelhas só responderam positivamente ao veneno de abelhas e da mesma forma os alérgicos a vespa *P. paulista* e os alérgicos a *Solenopsis* só responderam positivamente a estes venenos, respectivamente. Além desta análise, o critério de especificidade dos soros utilizado pelos pesquisadores do LIT, e, por conseguinte, neste trabalho, se deu por análises de testes de contato e de Western blot realizados previamente pelo grupo de pesquisa do LIT. Não foram realizados testes de ativação de basófilo para determinar a exclusividade de alergia a cada inseto.

Como mencionado no item 3.4 de Metodologia, foi realizada análise de Western blot com os 11 soros escolhidos reagindo à proteína alergênica recombinante ryPoly p 5 que foi transferida para a membrana de nitrocelulose. Foi preparado um gel de gradiente no qual ocorreu a corrida de 5µg da proteína ryPoly p 5 purificada obtida da expressão em levedura. A seguir foi realizada a transferência da proteína do gel para uma membrana de nitrocelulose, e ao término desta, ficou submersa em solução de bloqueio antes da aplicação do anticorpo primário, enquanto o gel foi corado com corante Coomassie Blue G-250. O procedimento do bloqueio impede a ocorrência de ligações inespecíficas entre o anticorpo IgE dos soros de pacientes com a membrana, de modo que hajam somente interações entre esse anticorpo e a proteína de interesse, no caso o antígeno ryPoly p 5, que foi transferida do gel.

Após o bloqueio, lavagem com TBS-T, corte da membrana em tiras, os soros diluídos (1:50) foram aplicados às membranas, seguindo o protocolo de detecção conforme descrito no Item 3.4 da Metodologia, em que o anticorpo secundário anti-IgE humana é ligado à enzima peroxidase, cujo substrato é a água oxigenada (H₂O₂). No kit utilizado ou a H₂O₂ está acoplada a uma molécula quimioluminescente, ou a H₂O₂ é substituída por uma molécula quimioluminescente análoga a ela ou ainda, este substrato está dissolvido em uma substância quimioluminescente. Deste modo, quando se adiciona o substrato apropriado para a enzima (ou seja, H₂O₂ acoplada, substituída ou dissolvida em uma substância química) a reação irá resultar neste caso em emissão de luz, que é captada por um fotodocumentador específico.

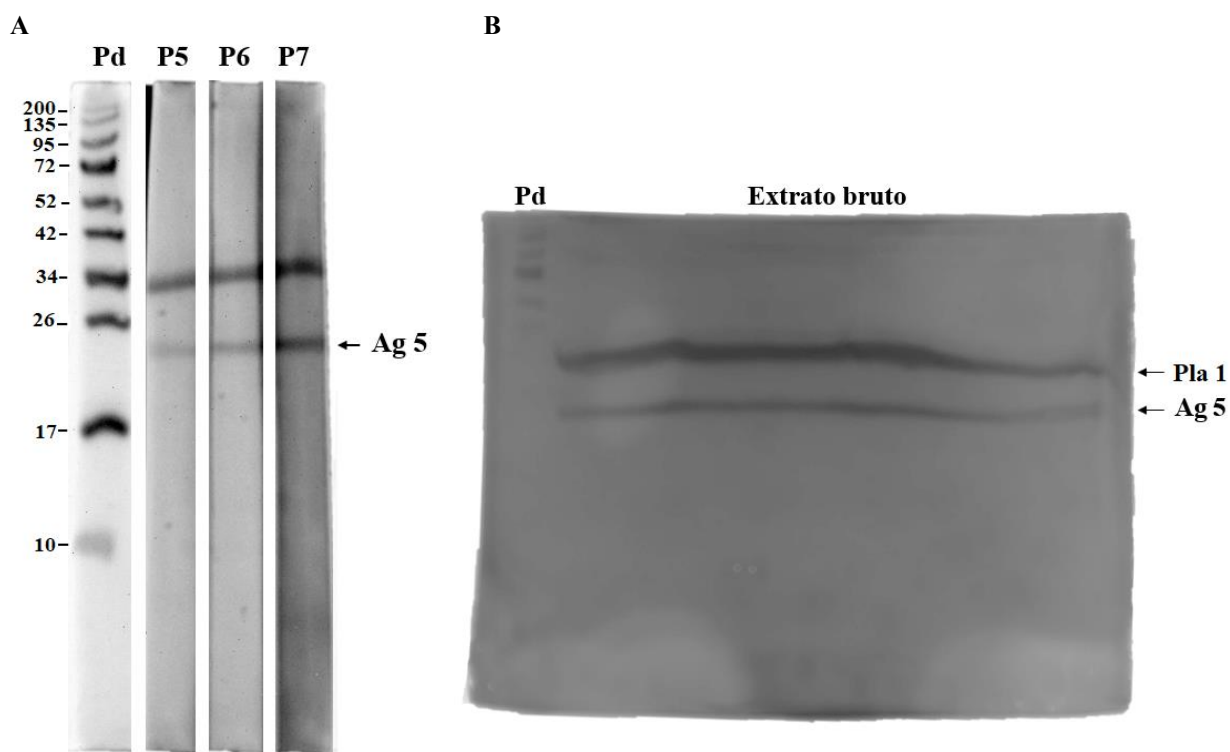
Os resultados podem ser visualizados na Figura 8 (A,B), onde se observa a presença de uma banda correspondente à reação de IgE de todos os soros testados ao antígeno ryPoly p 5.

Figura 8 A, B. (A) Resultado das análises de Western blot para a imunoreatividade, mediada por IgE de soros (diluição 1:50) de pacientes alérgicos ao veneno de Hymenoptera. **Pd**: padrão de massa molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Fermentas Life Sciences); **P1, P2, P3 e P4**: soros de pacientes alérgicos a veneno de *A. melifera*; **P5, P6 e P7**: soros de pacientes alérgicos a veneno de *P. paulista*; **P8, P9, P10 e P11**: soros de pacientes alérgicos a veneno de *S. invicta*. (B) Coloração do gel de gradiente 10% - 20% com prata, o qual havia sido utilizado para a transferência pela técnica de Western blott, e onde haviam sido aplicados 5µg do alérgeno ryPoly p 5 recombinante.



O mesmo procedimento de análise de Western Blot foi realizado com os soros de pacientes alérgicos a vespa *P. paulista* contra o extrato de veneno bruto desta mesma vespa. Este experimento foi usado como controle positivo da detecção imunológica destes soros aos alérgenos desse veneno (Figura 9A,B).

Figura 9 A, B. (A) Análise de Western blot para a imunoreatividade, mediada por IgE de soros de pacientes alérgicos ao veneno *P. paulista* contra o extrato bruto do próprio veneno de *P. paulista*, usado como controle positivo. **Pd**: padrão de massa molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Fermentas Life Sciences); **P5 e P6**: soros de pacientes alérgicos ao veneno *P. paulista* na diluição 1:50; **P7**: soro de paciente alérgico ao veneno *P. paulista* na diluição 1:100. (B) Gel de gradiente a 10% - 20% corado com prata para controle da transferência das proteínas para a membrana utilizada na técnica de Western blott. Neste gel foram aplicados 100µg do extrato bruto de veneno de *P. paulista*. Nota-se que a maior parte das proteínas do extrato bruto foram transferidas, enquanto que parte das proteínas de maior abundância (PLA1 e Ag5) ainda permanecem no gel.



Esperava-se que dos soros selecionados, somente os de pacientes alérgicos a vespas e formigas demonstrassem a imunodeteção positiva ao alérgeno em estudo, já que somente esses insetos apresentam comprovadamente o Antígeno 5 como componente de seus venenos (HOFFMAN, 1993). No entanto, é possível observar que dos 11 soros de pacientes testados, 10 reagiram com intensidades semelhantes e apenas o soro P3 com uma menor intensidade, sendo ele alérgico a abelha (*Apis mellifera*). É possível que os soros de pacientes alérgicos a

abelhas tenham reconhecido o ryPoly p 5 devido à presença, em seus venenos, de uma molécula paróloga ao Ag5 de vespas e formigas, denominada Apidaecina, a qual também foi encontrada no cérebro e intestino desses insetos. Esse componente, no entanto, tem aproximadamente 10kDa e apenas 25% de similaridade ao Ag5, causando incerteza se seria o possível responsável pelo resultado positivo obtido como resposta dos soros de pacientes alérgicos a abelha, já que o tamanho da proteína paróloga que estaria reconhecendo é quase metade do Ag5 (VAN VAERENBERG et al., 2013).

Há também possibilidade de tal resultado ter sido apresentado em razão de que no critério de seleção dos soros de pacientes alérgicos exclusivamente a um dos insetos deste estudo, foi utilizado o veneno bruto de cada um deles. Dessa forma, os soros responderam a todos os componentes do veneno bruto de abelha, vespa e formiga, que interagem entre si para gerar a resposta alérgica. No presente estudo, os soros responderam somente ao Ag5 recombinante purificado, que pode causar resposta diferenciada da observada pelo veneno bruto, visto que moléculas similares a este alérgeno são encontradas em diversos sistemas e organismos e não tem função determinada.

Assim sendo, os resultados positivos desta análise indicam que há necessidade de utilização de um maior número de soros, já que foi demonstrada reatividade cruzada com pacientes alérgicos a abelhas e formigas, e não foi possível obter a reação imunológica específica ao ryPoly p 5. Mais uma alternativa ao estudo é utilizar dois ou mais alérgenos associados na análise de Western blot com soros de pacientes, podendo ser, por exemplo, Ag5 e PLA, já que a PLA1 está presente no veneno de vespa e no veneno de abelha, a PLA2, tendo assim potencial de diferenciar a resposta dos soros de pacientes alérgicos a abelha e a vespa.

5. Conclusão

Os resultados das análises com soro de pacientes alérgicos a diferentes insetos himenópteros, a *Solenopsis invicta*, a *Apis mellífera* e *Polybia paulista*, demonstraram que o IgE destes pacientes é capaz de reconhecer imunologicamente o alérgeno Poly p 5, expresso em levedura *K. phaffii*, de forma inespecífica, ou seja, por reação imunológica cruzada. A resposta negativa indicaria a possibilidade do uso deste alérgeno de modo específico no diagnóstico molecular de reações alérgicas sistêmicas a ferroadas destes insetos em substituição aos venenos brutos ou kits importados, porém dos 8 soros de pacientes alérgicos a abelhas e formigas, somente 1 reagiu com menor intensidade. Tal fato indica que, de primeira mão, o Ag5 recombinante ainda não pode ser utilizado em diagnóstico por componente resolvido.

Deste modo, ainda precisará ser utilizado um maior número de soros para que estes resultados possam ser confirmados, e então aprimorar o diagnóstico de alergia a insetos sociais existentes no Brasil com uso do ryPoly p 5 isolado ou em adição aos demais alérgenos majoritários (Hyal: rPoly p2 e PLA1: rPoly p1) na forma recombinante, os quais vem sendo caracterizados por nosso grupo de pesquisa.

6. Referências

- AALBERSE, R.C. **Structural Biology of Allergens.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106 (2): 228-238, 2000.
- AGUIAR, M. B. De. **Estudo estrutural por RMN do Peptídeo Policatiônico Polybline I de Veneno da Vespa Social *Polybia paulista*.** 99 f. Dissertação (mestrado) em Biofísica Molecular, área de concentração: Biofísica Molecular - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.
- ANTONICELLI, L.; BILÓ, M.B.; BONIFAZI, F. **Epidemiology of Hymenoptera allergy,** *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2: 341–346, 2002.
- BAZON, M.L. **Expressão heteróloga, purificação e análise da imunoreatividade do alérgeno antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae).** 84 f. Dissertação (mestrado) em Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.
- BLANK, S.; NEU, C.; HASCHE, D.; BANTLEON, F.I.; JAKOB, T.; SPILLNER, E. **Polistes species venom is devoid of carbohydrate-based cross-reactivity and allows interference-free diagnostics.** *J Allergy Clin Immunol* 131(4):1239-1242, 2013
- BLUM, H; BEIER, H; GROSS, HJ. **Improved silver staining of plant protein, RNA, DNA in polyacrylamide gels.** *Electrophoresis* v. 81, p. 93-99, 1987
- CASTRO, F.F.M.; PALMA, M.S. **Alergia a Venenos de Insetos.** 1. ed. Barueri, SP:Manole, 2009.
- DEMAIN A.L., VAISHNAV P. **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms.** *Biotechnol. Adv.*, 27(3):297-306, 2009.
- GIBBS, G. M.; ROELANTS, K.; O'BRYAN, M. K. **The CAP Superfamily: Cysteine- Rich Secretory Proteins, Antigen-5 and Pathogenesis-Related 1 Proteins – Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense.** *Endocrine Reviews*, 29(7): 865-897, 2008.
- HOFFMAN, D.R. **Allergens in Hymenoptera venom XXV: the amino acid sequences of antigen 5 molecules. The structural basis of antigenic cross- reactivity.** *J Allergy Clin Immunol*, 1993;92:707–716
- JUSTO-JACOMINI, D.L. et al. **Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis.** *Toxicon* 64: 60–80, 2013.
- JUSTO JACOMINI, D. L.; GOMES MOREIRA, S. M.; CAMPOS PEREIRA, F. D.; ZOLLNER, R. D. L.; BROCHETTO BRAGA, M. R. **Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom.** *Toxicon*, [s. l.], v. 82, p. 104–111, 2014.

- KING, T.P.; MORAN, D.; WANG, D.F.; KOCHOUMIAN, L. CHAIT, B.T. **Structural studies of a hornet venom allergen antigen 5, Dol m V and its sequence similarity with other proteins.** *Protein Seq. Data. Anal.*, New York, 3 (3): 263- 266, 1990.
- LOCHER, G.D.A.; TOGNI, O.C.; SILVEIRA, O.T.; GIANNOTTI, E. **The social wasp fauna of a Riparian forest in southeastern Brazil (Hymenoptera, Vespidae),** *Sociobiology* 61: 225 – 233, 2014
- MONSALVE, R.I.; et al. **Component-resolved diagnosis of vespid venom- allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization.** *Allergy* 67: 528–536. 2012.
- NAKAJIMA, T.; YASUHARA, T.; UZU,S.; WAKAMATSU,T.; FUKUDA, K.; TSUKAMOTO, Y. **Wasp, kinins, new cytotoxic peptide families and their physicochemical properties.** *Peptides* 6: 425-430, 1985.
- OLLERT, M.; BLANK, S. **Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics.** *Curr Allergy Asthma Rep.* 15-26, 2015.
- PALMA, M.S. **Insect venom peptides.** In: Kastin, A.J. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides.* Academic Press, Burlington, pp. 389–396, 2006.
- PEREIRA-BOMFIM, M. DA G. C. **Community Structure of Social Wasps (Hymenoptera: Vespidae) in Riparian Forest in Batayporã, Mato Grosso do Sul, Brazil.** *Sociobiology*, v. 59, n. 3, p. 755–765, 5 set. 2014.
- PEREZ-RIVEROL, A. et al. **Wasp venom: unravelling the toxins arsenal of *Polybia paulista* venom and its potential pharmaceutical applications.** *Journal of Proteomics* 161: 88-103, 2017.
- PEREZ-RIVEROL, A. et al. **Venoms of Neotropical wasps lack crossreactive carbohydrate determinants enabling reliable protein-based sIgE determination,** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141(5): 1917–1919.e1, 2018.
- PETERS, R. S.; KROGMANN, L.; MAYER, C.; DONATH, A.; GUNKEL, S.; MEUSEMANN, K.; KOZLOV, A.; PODSIADLOWSKI, L.; PETERSEN, M.; LANFEAR, R.; DIEZ, P. A.; HERATY, J.; KJER, K. M.; KLOPFSTEIN, S.; MEIER, R.; POLIDORI, C.; SCHMITT, T.; LIU, S.; ZHOU, X.; WAPPLER, T.; RUST, J.; MISOF, B.; NIEHUIS, O. **Evolutionary History of the Hymenoptera.** *Current Biology*, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 1013–1018, 2017.
- SEDMAK, J. J., GROSSBERG, S. E. **A rapid sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250.** *Analytical Biochemistry* 79: 544- 552, 1977.
- SOMAVILLA, A.; DE OLIVEIRA, M. L.; RAFAEL, J. A. **Social wasps (Vespidae: Polistinae) from two Nacional Parks of the Caatinga Biome, in Brazil.** *Sociobiology*, v. 64, n. 3, p. 334, 17 out. 2017.
- VAN VAERENBERGH, M.; CARDOEN, D.; FORMESYN, E.M.; BRUNAIN, M.; VAN DRIESSCHE, G.; BLANK, S.; SPILLNER, E.; WENSELEERS, T.; VERLEYEN, P.;

SCHOOFS, L.; DEVREESE, B.; GRAAF, D.C. **Extending the honey bee venom with the antimicrobial peptide apidaecin and a protein resembling wasp antigen 5.** *Insect Molecular Biology*, 199-210, 2013.

VINZON, S.E. et al. **Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a hypoallergenic antigen 5.** *Protein Expression and Purification* 73: 23–30. 2010.