

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**Expressão heteróloga, purificação e análise da imunoreatividade do  
alérgeno antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista*  
(Hymenoptera, Vespidae)**

**MURILO LUIZ BAZON**



0110008423

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**MURILO LUIZ BAZON**

**Expressão heteróloga, purificação e análise da imunoreatividade do alérgeno  
antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae)**



**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Brochetto Braga**

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

**Rio Claro - SP**

**2017**

SVE

Class	595.798
	B364e
Tombo	T-8423

BRC 23487

UNØ476879Ø5

595.798 Bazon, Murilo Luiz  
B364e Expressão heteróloga, purificação e análise da  
imunoreatividade do alérgeno antígeno 5 do veneno de  
Polybia paulista (Hymenoptera, Vespidae) / Murilo Luiz  
Bazon. - Rio Claro, 2017  
84 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Márcia Regina Brochetto Braga

1. Vespa. 2. Pichia pastoris. 3. Alérgeno recombinante. I.  
Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

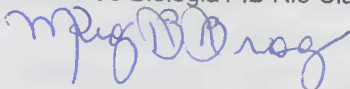
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Expressão heteróloga, purificação e análise da imunoreatividade do alérgeno antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae)

AUTOR: MURILO LUIZ BAZON

ORIENTADORA: MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA

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

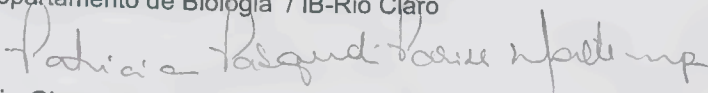
Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA  
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. PATRICIA UCELLI SIMIONI  
Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes / UNICAMP



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI  
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro



Rio Claro, 23 de fevereiro de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais, **Sebastião Bazon** e **Suseli Bazon**, à minha irmã **Aline Bazon**, e à minha avó querida **Izaltina Leance**, por todo amor, dedicação, paciência, ensinamento, investimento e por acreditarem em mim. Sem vocês nada disso seria possível.

Meu chão, a base de tudo. **MUITO OBRIGADO, AMO VOCÊS!**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e por me dar forças quando me sentia esgotado.

Aos meus avós: vô **Nico** (em memória), vô **Zé Bazon** (em memória) e vô **Alzira** (em memória), sem vocês eu nada seria. Sempre serão lembrados como a melhor parte da minha vida.

À minha orientadora, **Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Brochetto Braga**, pelos ensinamentos e excelente orientação, grande responsável pela minha formação científica. Pela confiança em mim depositada, por acreditar que eu poderia desenvolver um bom trabalho. Agradeço pela paciência e críticas.

Ao **Amilcar Perez-Riverol** pelos ensinamentos, discussões científicas, pela prontidão em ajudar e pela amizade.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por todo conhecimento obtido através deles e pela ajuda sempre que necessitada.

Ao grupo de pesquisa "*Polybia paulista*": **Isabela, Geovana, Laís e Roger**, pelo café da tarde, risadas e pelas extrações de glândulas.

Ao meu irmão, **Arthur Galleti Lima**, pelas caminhadas, apoio constante em toda essa trajetória, pelas risadas diárias e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes, que contribuíram de alguma forma para esse trabalho, direta ou indiretamente. **Brenda, Letícia Rocha, Letícia Ramos e Kelvin**, pelas conversas engraçadas e bons momentos que passamos juntos.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta etapa, pela dedicação, amizade, alegrias e amparo que me deram sempre que precisei.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP, em especial ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

À minha irmã lindona, **Aline Bazon**, pela cumplicidade, apoio e pelas palavras de conforto. Te amo muito, bolota.

Aos meus pais, **Sebastião Bazon** e **Suseli Bazon**, que de vocês recebi o dom mais precioso, a "vida". Sempre me apoiando, mostrando o caminho certo, dedicando, me compreendendo e enchendo a minha vida de amor. Não existem palavras que eu possa escrever para expressar a minha gratidão. Se um dia eu conseguir ser metade do que vocês são, estarei realizado.

A todos que contribuíram de alguma forma para o êxito deste trabalho.

**“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”**

**(Theodore Roosevelt)**

## RESUMO

A vespa social *Polybia paulista* é muito agressiva e abundante nos Estados de São Paulo e Sul de Minas Gerais e, responsável por muitos acidentes de importância médica. Os principais alérgenos (Fosfolipase, Hialuronidase e Antígeno 5) de seu veneno já foram caracterizados por estudos proteômicos porém, os estudos em nível molecular estão em andamento pelo nosso grupo. O Antígeno 5 (Ag 5) (~23 kDa) tem sido relatado, em alguns venenos de vespas, como um dos mais abundantes e importantes alérgenos, com elevada prevalência de ligação a IgE (em *Vespula vulgaris* e em *Polistes versicolor*) enquanto que em outros, como uma molécula hipoalergênica (em *Polybia scutellaris*). No Brasil, ainda não existem extratos alergênicos ou componentes padronizados para o tratamento e diagnóstico de alergia ao veneno de Hymenoptera. Neste trabalho, o Ag 5 de *P. paulista* foi clonado, sequenciado, expresso utilizando a levedura *Pichia pastoris* X-33, purificado e analisado mediante a imunodeteção por IgE. Os maiores níveis de expressão da proteína recombinante *rPoly p 5* foram obtidos em meio BMMY, a 28°C após 120 horas de indução com metanol. O alérgeno recombinante (*rPoly p 5*), obtido no meio extracelular, foi purificado por cromatografia de afinidade em resina de Ni<sup>2+</sup> e posteriormente por exclusão molecular em coluna de Sephadex-G 100 acoplada a um sistema AKTA-FPLC, com um rendimento de 158 µg/mL. Em paralelo, o Ag 5 nativo (*nPoly p 5*) foi extraído de glândulas de veneno de *P. paulista* e purificado através de cromatografia de troca catiônica. Análise de *Western Blotting* foi realizada para avaliar a reatividade IgE dos soros de 10 pacientes alérgicos ao veneno de *P. paulista* para *rPoly p 5* e *nPoly p 5*. Os resultados obtidos mostraram que *P. pastoris* é um sistema muito viável para a produção heteróloga do alérgeno *rPoly p 5* e que ambas as formas desse alérgeno foram capazes de se ligar à IgE de todos os soros de pacientes alérgicos testados. Portanto, os dados aqui encontrados podem ser utilizados para melhoria no diagnóstico e imunoterapia específica de alergia ao veneno de *Polybia paulista*.

Palavras chave: *Polybia paulista*, Antígeno 5, Expressão heteróloga, *Pichia pastoris*, alérgeno recombinante

## ABSTRACT

The social wasp *Polybia paulista* is very aggressive and abundant in the states of São Paulo and South of Minas Gerais, responsible for many accidents of medical importance. The major allergens (Phospholipase, Hyaluronidase and Antigen 5) of its venom have already been characterized by proteomic studies. However, studies at the molecular level are in progress by our group. Antigen 5 (Ag 5) (~ 23 kDa) has been reported in some wasp venoms as one of the most abundant and important allergens with a high prevalence of IgE binding (in *Vespula vulgaris* and in *Polistes versicolor*), while in others as a hypoallergenic molecule (in *Polybia scutellaris*). In Brazil, there are no standardized allergenic extracts or components for treatment and diagnosis of allergy to Hymenoptera venoms. In this work, Ag 5 from *P. paulista* was cloned, sequenced, expressed using the *Pichia pastoris* X-33 yeast, purified and analyzed by immunodetection by IgE. The highest levels of expression of the rPoly p 5 recombinant protein were obtained in BMMY medium at 28 ° C after 120 hours of methanol induction. The recombinant allergen (rPoly p 5) obtained in the extracellular medium was purified by Ni<sup>2+</sup> resin affinity chromatography and subsequently by column exclusion of Sephadex-G 100 coupled to an AKTA-FPLC system with an yield of 158 µg/mL. In parallel, the native Ag 5 (nPoly p 5) from *P. paulista* venom glands was purified by cation exchange chromatography. Western Blotting analysis was used to evaluate the IgE reactivity of the sera from 10 patients allergic to the *P. paulista* venom for rPoly p 5 and nPoly p 5. The results obtained showed that *P. pastoris* is a very feasible system for the heterologous production of rPoly p 5 and that both forms of this allergen were able to bind to IgE from all sera of allergic patients tested. We conclude that data found here can be used to improve the diagnosis and specific immunotherapy of allergy to *Polybia paulista* venom.

Keywords: *Polybia paulista*, Antigen 5, heterologous expression, *Pichia pastoris*, recombinant allergen

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Polybia paulista</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Taxonomia de Hymenoptera .....	15
<b>Figura 3.</b> Modelo molecular tridimensional do alérgeno Ag 5 do veneno da vespa social <i>Polybia paulista</i> .....	20
<b>Figura 4.</b> Mapa dos Vetores de expressão pPICZαA, B e C .....	39
<b>Figura 5.</b> Perfil eletroforético obtido em gel de agarose a 1,5% para amostras de RNA total. ....	46
<b>Figura 6.</b> Perfil eletroforético do pool de cDNA referentes aos RNAs totais.....	47
<b>Figura 7.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose da banda de cDNA obtida por PCR gene-específico. ....	48
<b>Figura 8.</b> Resultado da análise de restrição com <i>Eco</i> RI das preparações plasmidiais da Tabela 5. ....	49
<b>Figura 9.</b> Análise da sequência cDNA consenso.....	51
<b>Figura 10.</b> Resultado de Blast para a sequência de nucleotídeos do alérgeno de veneno <i>Poly p 5</i> e o mesmo alérgeno encontrado nos venenos de outras vespas...	53
<b>Figura 11.</b> Alinhamento das sequências de cDNA do alérgeno <i>Poly p 5</i> do veneno de <i>P. paulista</i> e do mesmo alérgeno no veneno de <i>Polybia scutellaris</i> .....	54
<b>Figura 12.</b> Análise de Orf Finder da sequência de cDNA completa de <i>Poly p 5</i> .....	55
<b>Figura 13.</b> Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias do alérgeno Ag 5 e de proteínas Ag 5-like em diferentes organismos .....	56
<b>Figura 14.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% em TAE 0,5X das preparações plasmidiais do clone GL2.....	58
<b>Figura 15.</b> Perfil eletroforético da banda de <i>Poly p 5</i> já contendo os sítios de restrição de <i>Nde</i> I e <i>Eco</i> RI em gel de agarose a 1,5% em TAE 0,5X. ....	59
<b>Figura 16.</b> Detecção dos transformantes positivos utilizando os <i>primers</i> de seqüenciamento 5'AOX1 e 3'AOX1.....	61
<b>Figura 17.</b> Placa YPD contendo colônias de X-33/pPICZαA-Ag 5.....	61
<b>Figura 18.</b> Análise de SDS-PAGE da expressão <i>rPoly p 5</i> em <i>P. pastoris</i> induzida à 28°C com metanol a 1%.....	62

<b>Figura 19.</b> Purificação do alérgeno recombinante <i>rPoly p 5</i> por cromatografia de afinidade. Análise das frações eluídas da coluna Ni-NTA realizada em SDS-PAGE 12%.....	64
<b>Figura 20.</b> Perfil cromatográfico de <i>rPoly p 5</i> por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-100 acoplada ao sistema ÄKTA-FPLC .....	65
<b>Figura 21.</b> Análise das frações do perfil cromatográfico de <i>rPoly p 5</i> (pico 1 e pico 2). .....	66
<b>Figura 22.</b> Análise das frações 90,91 e 92, provenientes do pico 2, obtidas na cromatografia por exclusão molecular e correspondente à forma de <i>rPoly p 5</i> de ~23kDa.....	66
<b>Figura 23.</b> <i>Western blot</i> com anticorpo Penta His-(1: 2000) para detecção da <i>rPoly p 5</i> .....	67
<b>Figura 24.</b> Perfil cromatográfico de troca catiônica do extrato de veneno bruto de <i>P. paulista</i> (23 mg) em coluna Hiprep FF CM (16 x 10 mm, 20 mL; GE Healthcare) acoplada em sistema AKTA-FPLC.....	68
<b>Figura 25.</b> Análise das purificações ( <i>rPoly p 5</i> e <i>nPoly p 5</i> ) e veneno bruto de <i>P. paulista</i> .....	69
<b>Figura 26 A e B.</b> Análises de <i>Western blot</i> de mostrando a reatividade mediada por IgE, presente em soros (diluídos a 1:50) de pacientes alérgicos ao veneno de <i>P. paulista</i> contra <i>nPoly p 5</i> purificado e <i>rPoly p 5</i> .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência de <i>primers</i> específicos. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Sequência de <i>primers</i> do kit pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® utilizados para o sequenciamento. ....	37
<b>Tabela 3.</b> Sequência de <i>primers</i> para expressão do alérgeno <i>Poly p 5</i> . ....	37
<b>Tabela 4.</b> Valores obtidos para as concentrações e razões de Absorbância 260/280; para amostras de RNA total extraídos de glândulas de veneno de vespas <i>P. paulista</i> . ....	46
<b>Tabela 5.</b> Valores obtidos das concentrações de DNA para as preparações plasmidiais dos clones analisados. ....	49
<b>Tabela 6.</b> Acompanhamento do nível de expressão da proteína alergênica <i>rPoly p 5</i> em <i>P. pastoris</i> , após a indução de metanol a 1% adicionado a cada 24h. ....	62
<b>Tabela 7.</b> Quantificação da proteína <i>rPoly p 5</i> ....	70

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Ordem Hymenoptera.....	13
1.2 Venenos de Vespas .....	15
2 ANTÍGENO 5.....	18
2.1 Primeiros relatos e características gerais .....	18
2.2 Superfamília CAP.....	19
2.3 Isoformas do Ag 5 e abordagem proteômica .....	20
2.4 Reatividade cruzada .....	21
2.5 Potencial da molécula Ag 5.....	23
2.6 Expressão heteróloga do Ag 5.....	24
2.7 Sistema de expressão – <i>Pichia pastoris</i> .....	26
2.8 Importância médica da imunoterapia contra a alergia a venenos de insetos...28	
3 JUSTIFICATIVA .....	29
4 OBJETIVOS .....	31
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 Soros de pacientes alérgicos .....	31
5.2 Coleta das amostras de <i>Polybia paulista</i> .....	31
5.3 Extração do RNA total.....	32
5.4 Síntese da primeira fita de cDNA.....	32
5.5 Análises Eletroforéticas.....	32
5.5.1 Eletroforese de RNA e DNA .....	32
5.5.2 Eletroforese de Proteínas .....	33
5.6 Desenho dos <i>primers</i> gene-específicos para a amplificação do cDNA de <i>Poly p 5</i> .....	34
5.7 Padronização e estabelecimento das melhores condições, para amplificação por PCR, e purificação do cDNA completo de <i>Poly p 5</i> .....	34
5.8 Clonagem em vetor pCR™8/GW/TOPO.....	35
5.8.1 Reação de ligação de cDNA de <i>Poly p 5</i> em vetor .....	35
5.8.2 Transformação em <i>E. coli</i> One Shot® .....	35
5.9 Extração de plasmídeo e análise dos clones recombinantes.....	36
5.10 Sequenciamento do cDNA de <i>Poly p 5</i> e análise das sequencias de Banco de dados .....	36
5.11 Desenho dos primers para a amplificação do cDNA completo de <i>Poly p 5</i> ...	37
5.12 Otimização das condições de PCR com os <i>Primers</i> de expressão.....	37

5.13 Síntese do gene <i>Poly p 5</i> e subclonagem em vetor de expressão de <i>Pichia pastoris</i> .....	38
5.14 Expressão do <i>Poly p 5</i> -pPICZ $\alpha$ A em <i>Pichia pastoris</i> .....	39
5.14.1 Precipitação de proteínas totais e análise em SDS-PAGE .....	41
5.15 Purificação r <i>Poly p 5</i> de <i>P. pastoris</i> .....	41
5.16 Purificação do antígeno 5 nativo de <i>P. paulista</i> (n <i>Poly p 5</i> ) .....	42
5.17 Dosagem de proteínas totais .....	42
5.18 Imunodeteção por Western Blot.....	42
5.19 Detecção de r <i>Poly p 5</i> – “Anti-His Selector Kit” .....	43
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6.1 Obtenção, dosagem e análise de RNA total em gel de agarose.....	45
6.2 Obtenção e análise do pool de cDNA .....	46
6.3 Amplificação do cDNA de <i>Poly p 5</i> por PCR gene-específico.....	47
6.4 Seleção dos clones recombinantes de <i>Poly p 5</i> , extração plasmidial e análise por digestão. ....	48
6.5 Sequenciamento, análise das sequências e desenho dos primers específicos de expressão .....	50
6.6 Otimização das reações de PCR para obtenção e amplificação da sequência de cDNA de <i>Poly p 5</i> a ser clonada em vetor de expressão .....	58
6.7. Síntese do gene <i>Poly p 5</i> (GenScript), Clonagem em vetor pUC57, subclonagem em vetor pPICZ $\alpha$ A para expressão em <i>Pichia pastoris</i> X-33 .....	59
6.8 Transformação e Identificação dos clones positivos .....	60
6.9. Expressão de <i>Poly p 5</i> - pPICZ $\alpha$ A .....	61
6.10 Purificação e análise da amostra de r <i>Poly p 5</i> – <i>Pichia pastoris</i> (120 horas) em coluna de His-Trap Ni <sup>+2</sup> .....	63
6.11. Purificação de r <i>Poly p 5</i> por exclusão molecular em coluna Sephadex G-100 .....	65
6.12 Confirmação da obtenção e purificação de r <i>Poly p 5</i> (23KDa) por anticorpo anti-His.....	67
6.13. Purificação e dosagem de n <i>Poly p 5</i> .....	68
6.14 Imunodeteção mediada por IgE .....	70
7 CONCLUSÕES .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Ordem Hymenoptera

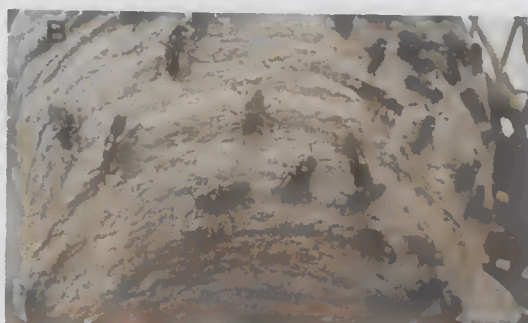
A ordem Hymenoptera é um dos maiores grupos de insetos existentes, no qual se classificam vespas, abelhas, formigas e moscas-da-serra. Já foram descritas aproximadamente 115.000 espécies, com 99 famílias (HANSON, GAULD, 1995). O número de espécies aculeadas é de aproximadamente 50 mil, das quais, 10 a 15 mil são formigas, 10 mil abelhas e as demais, vespas. De acordo com sua história evolutiva, os Hymenoptera podem ser classificados em dois grupos: social e solitário. A maioria desenvolveu glândulas especializadas para a produção de veneno e um aparelho de ferroar, os quais podem ser utilizados tanto na caça de presas quanto em sua própria defesa. Assim, o estudo do veneno torna-se bastante importante para melhor compreendermos as alergias ocasionadas pelos acidentes por ferroadas causadas por esses insetos (STEEN et al., 2005). Baseado na biologia e comportamento desses insetos, o veneno e o aparelho de ferroar sofreram alterações ao longo dos tempos, evoluindo para melhor adaptação dessas espécies (PALMA, 2006). Os Aculeata mais primitivos atualmente são representados pelos Scoliidea, vespas escavadoras que parasitam larvas de besouros e outras espécies de vespas. As formas ancestrais dessas vespas provavelmente deram origem a três linhas evolutivas maiores de aculeados que culminaram nas abelhas, vespas e formigas (CHAUD NETTO et al., 1994). Eventuais ferroadas causadas por esses insetos representam 1,5% - 34,1% de todos os tipos de anafilaxia relatados por ano (BILÒ, 2005).

Em países tropicais, como o Brasil, existem aproximadamente 320 espécies de vespas sociais, as quais, constituem um perigo potencial para os seres humanos (FINEGOLD et al., 2000). A exemplo disto, a vespa social *Polybia paulista* (*P. paulista*) (Figura 1), conhecida popularmente como "paulistinha", é muito comum no Sudeste do Brasil, principalmente no Estado de São Paulo e tem sido responsável pelo crescente número de acidentes registrados. Isto se explica pelo fato de que estas vespas se adaptaram a áreas urbanas como refúgio, devido ao desmatamento das florestas (seu habitat natural), construindo seus ninhos em cidades junto às edificações humanas (AGUIAR 2006).

Esse tipo de vespa tem como características formar grandes colônias (mil a 5 mil indivíduos), construir seus ninhos com vários favos, usando materiais vegetais que são coletados, triturados e umedecidos com secreção. Os ninhos são envolvidos por uma cobertura protetora com um único orifício de acesso e é essa característica que diferencia as espécies do gênero *Polybia* das outras (AGUIAR, 2006). As fundações de novos ninhos ocorrem o ano todo independente das condições climáticas. A sua alimentação é composta por proteínas (insetos), carboidratos (néctar), polpa de madeira e água (CASTRO, PALMA, 2009). A *P. paulista* é uma das vespas sociais mais agressivas, sendo responsável por inúmeros acidentes de grande interesse médico, o que justifica a necessidade de caracterização dos principais compostos alergênicos de seu veneno.

Figura 1. *Polybia paulista*

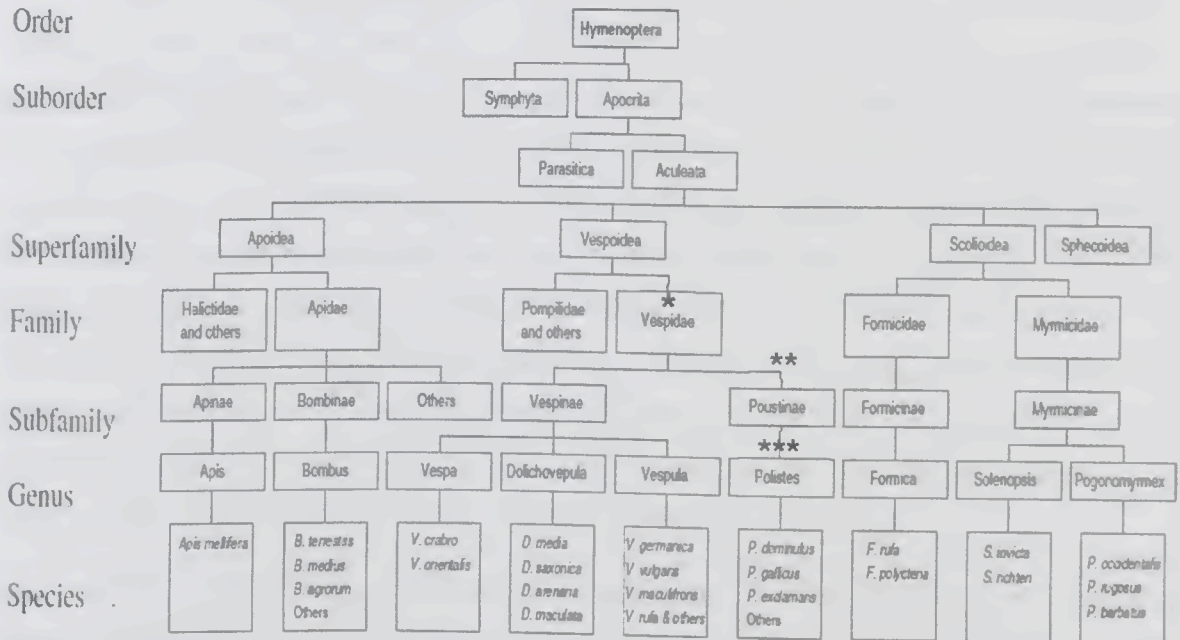
A



Fonte: (A) <https://www-tc.pbs.org/wqbh/nova/anext/wp-content/uploads/2015/09/Polybia-paulista.jpg>.  
(B) [https://c1.staticflickr.com/3/2910/14453223979\\_b9da83f9cc\\_b.jpg](https://c1.staticflickr.com/3/2910/14453223979_b9da83f9cc_b.jpg)

**Figura 2.** Taxonomia Hymenoptera. (\*) A Família Vespidae inclui as Subfamílias: Eumeninae, Euparaginae, Masarinae, Polistinae (\*\*), Stenogastrinae, Vespinae. O Gênero *Polybia* faz parte de uma das Nove tribos integram a Subfamília de Polistinae (\*\*), estando entre eles, as tribos Polistes (\*\*\*) e Epiponini (não mostrada no quadro) da qual faz parte o Gênero *Polybia*.

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=7438>.



Fonte: (BILÒ, 2005).

## 1.2 Venenos de Vespas

Os venenos de Hymenoptera são constituídos por uma mistura complexa de proteínas, enzimas, peptídeos biologicamente ativos e compostos de baixa massa molecular, os quais são responsáveis pelas dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas locais e sistêmicas (ESHER et al., 2001; FITZGERALD, 2006, SANTOS et al., 2007, MÜLLER, 2010, KARABUS, 2012). As proteínas e enzimas alergênicas encontradas nesses venenos apresentam a propriedade de induzir o sistema imune a produzir anticorpos com elevada especificidade, além de desencadear sintomas alérgicos em pacientes sensibilizados (AALBERSE, 2000). Reações sistêmicas ocorrem principalmente em pacientes alérgicos, comprometendo o bom funcionamento dos sistemas respiratório e circulatório. Os sintomas clínicos incluem urticária generalizada, angioedema, queda da pressão arterial, broncoespasmos, parada cardíaca e respiratória e choque anafilático (MINGOMATAJ et al., 2014). A prevalência estimada de reações sistêmicas associadas com alergia ao veneno de Hymenoptera (HVA) é de 0,3% - 8,9%, enquanto a anafilaxia ocorre em 0,3% - 42,8% dos casos (BILÒ et al., 2009).

A alergia ao veneno de Hymenoptera é uma das reações de hipersensibilidade mais severas no que diz respeito ao elevado risco de reações anafiláticas com resultados potencialmente fatais.

Pacientes alérgicos a venenos de vespas podem apresentar reações positivas a mais de um veneno de insetos da ordem Hymenoptera, o que pode ser ocasionado pela reatividade cruzada de um ou mais alérgenos, tanto devido à (a) similaridade entre suas sequências proteicas primárias bem como, (b) a regiões determinantes de carboidratos (CCDs) presentes nos epítomos destes antígenos. No primeiro caso, a reatividade cruzada é explicada pelo fato de que os anticorpos são produzidos contra regiões proteicas altamente conservadas (BARLOW et al., 1986; KING et al., 1996, CASTRO, PALMA, 2009) e no segundo caso, porque as regiões CCDs também são reconhecidas por moléculas de imunoglobulinas E específicas (IgEs), embora a significância clínica destas reações não tenha sido evidenciada até o momento (JIN et al., 2008; EBERLEIN et al., 2012; AL-GHOULEH et al., 2012).

Para os pacientes com reações anafiláticas ao veneno de Hymenoptera, o único tratamento causal e eficaz na redução do risco de subseqüentes reações sistêmicas é a imunoterapia. O diagnóstico de alergia compreende desde o histórico médico de reação sistêmica a uma ferroada, acrescido de uma resposta positiva ao teste cutâneo e a detecção de anticorpos IgE específicos ao veneno. Na prática clínica, o diagnóstico correto nem sempre é fácil devido a problemas e limitações de ambos os testes inerentes, especialmente quando o paciente não é capaz de identificar definitivamente o inseto culpado (OLLERT, BLANK, 2015).

Os venenos de vespas contém uma variedade de proteínas, sendo que, entre elas, as principais são: fosfolipases, hialuronidases, fosfatases ácidas, esterases antígenos 5 (HOFFMAN, 2006; SANTOS et al., 2007; JUSTO JACOMINI et al., 2013, SANTOS-PINTO et al., 2014 a,b) e serino-proteases (McNAIRY et al., 2000; HAN et al., 2008). Todas são proteínas antigênicas de elevada massa molecular que, quando injetadas durante o ato de ferroadar, iniciam uma resposta imune peculiar, sensibilizando alguns indivíduos.

As fosfolipases foram bioquimicamente caracterizadas em *Apis mellifera* (HABERMANN et al., 1957) e em alguns venenos de vespas neotropicais (CASTRO et al., 1994; OLIVEIRA et al., 1998; COSTA et al., 2000) e são responsáveis pela

hidrólise dos fosfolipídios da membrana plasmática das células, permitindo a difusão de algumas toxinas dos venenos para o interior das células. Essa enzima, juntamente com a hialuronidase, é responsável pela formação de edemas após a ferroadada (CASTRO et al., 2009).

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

As fosfatases são encontradas em grande quantidade em venenos de abelhas. Essas enzimas também atuam como alérgenos importantes (SCHMIDT et al., 1986). O veneno da vespa *P. paulista*, apresenta os dois tipos de atividades de fosfatase; a atividade ácida e a alcalina (OLIVEIRA, 1994). As esterases são importantes no processo de lise celular, mas segundo Schmidt et al. (1986) sua função específica ainda não está definida.

As proteases ainda têm sido pouco caracterizadas em venenos de insetos sociais (SCHMIDT, 1982; DOTIMAS, HIDER, 1987; BANKS, SHIPOLINI, 1986). A maioria desses venenos não contém quantidades significantes de proteases, porém, uma alta atividade já foi constatada no veneno de uma vespa social *Polistes infuscatus*, no de uma formiga *Eciton burchelli* e no de uma espécie de abelha *Bombus pennsylvanicus* (SCHMIDT et al., 1986; HOFFMAN, JACOBSON, 1996). As proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas, e o termo "peptidases" pode ser utilizado para denominar qualquer enzima que hidrolisa este tipo de ligação (VERMELHO, 2008).

O antígeno 5 (Ag 5) é um alérgeno bastante comum nos venenos dos himenópteros sociais. A função biológica desta proteína ainda é desconhecida, embora muitos estudos demonstrem sua alergenicidade. Além disso, há também um grande número de relatos sobre a presença de proteínas altamente semelhantes ao Ag 5 em diversos e diferentes sistemas animais e vegetais, tais como, no intestino de *Drosophila* (KOVALICK et al., 1998), em saliva de carrapatos (MANS et al., 2008),

em flebotomíneos (CHARLAB et al., 1999), mosquitos (CALVO et al., 2007), além de ter sido encontrado na glândula de veneno e cérebro de abelhas *Apis mellifera* (VAERENBERGH et al., 2013). King (1989) utilizando testes cutâneos demonstrou também a existência de reatividade cruzada entre Ag 5 de veneno de vespões com proteínas relacionadas à defesa contra patogenicidade em plantas (PRPs) – encontradas tanto em folhas de tabaco como no tomate.

O total desconhecimento da função do Ag 5, tanto no sistema de venenos quanto em outros sistemas onde tem sido relatado, se traduz na importância dos estudos e pesquisas que possam trazer maior discernimento sobre sua real função e potencialidades.

## 2 ANTÍGENO 5

### 2.1 Primeiros relatos e características gerais

Em 1978, King e colaboradores identificaram uma proteína de aproximadamente 23 kDa no veneno de *Dolichovespula maculata*, a qual nomearam de Antígeno 5 (Ag 5). A partir de então, o alérgeno Ag 5 tem sido frequentemente descrito nos venenos de diferentes espécies de vespas sociais pertencentes aos gêneros *Polistes*, *Dolichovespula*, *Vespa*, *Vespula* e *Polybia*, sendo relatado como o alérgeno majoritário presente no veneno destas vespas sociais (HOFFMAN, 2006; SANTOS et al., 2010, SANTOS-PINTO et al., 2014 a,b). Tem sido considerado como o componente mais alergênico do veneno de vespas; superando as enzimas hialuronidases, fosfolipases e fosfatases ácidas (NAKAJIMA, 1986).

Esse alérgeno apresenta: (a) massa molecular em torno de 23-26,5 kDa; (b) sequência N-terminal com elevada identidade, quando comparado entre os venenos de várias espécies de vespas sociais (HOFFMAN, 1993); (c) função biológica desconhecida (KING et al., 1990) e (d) as proteínas Ag 5 formam um clado importante e distinto de proteínas secretoras ricas em resíduos de cisteína (CRISP – *Cysteine Rich Secretory Proteins*). A análise de seus domínios proteicos mostra que este alérgeno é membro de uma superfamília denominada (CAP), cujos membros são encontrados numa ampla gama de microrganismos que abrangem cada um dos reinos, animal e vegetal, tal como as proteínas relacionadas à patogenicidade em plantas (*Pathogenesis-related – Pr 1*) (GIBBS, et al., 2008).

Proteínas relacionadas ao Ag 5 também são encontradas em células da glia de tumores cerebrais (HOFFMAN, 2006). De acordo com Milne et al. (2003), o Ag 5 parece ser uma proteína *protease-like*, pois apresenta grande similaridade de sequência com a protease do veneno de um caracol da família *Conidae*.

## 2.2 Superfamília CAP

A superfamília CAP, que inclui as proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISPs), o Ag 5, e as proteínas relacionadas à patogênese-1 (Pr-1), foi nomeada após o reconhecimento da similaridade de sequência entre CRISPs, tais como as encontradas em: (a) eucariotos (inclusive em leveduras), (b) em venenos de répteis; (c) entre as proteínas de defesa contra a patogenicidade em plantas ou outra resposta ao estresse (PR; PR-1) como as encontradas na folha de tabaco e no tomate (P14-A-PRPs); (e) as proteínas ricas em cisteína (CRISP), específicas de órgãos reprodutores de mamíferos (TPX-1), compreendendo três domínios: N-terminal do domínio PR, uma região dobradiça, e um domínio C-terminal rico em cisteína (PADAVATTAN, et. al., 2008). Evidências sugerem papéis importantes para CAPs em biologia dos mamíferos, os quais se referem à função reprodutiva, à imunologia, controle do câncer e doenças crônicas, à organogênese e ao desenvolvimento (GIBBS, et. al., 2008).

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

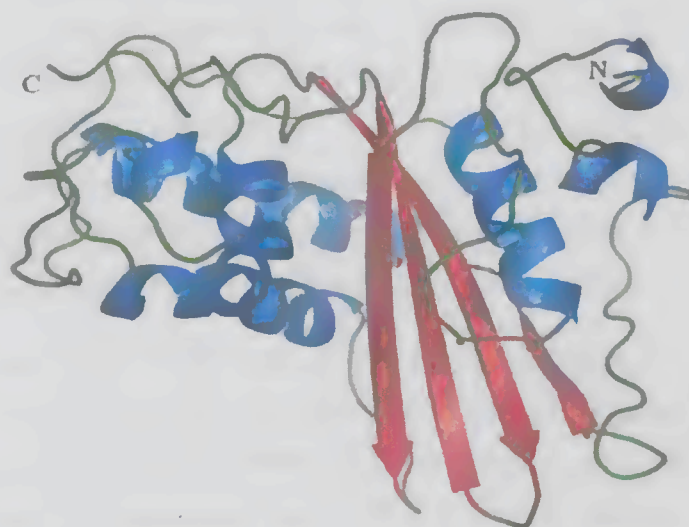
Os membros da superfamília CAP são encontrados em uma enorme variedade de organismos. São proteínas frequentemente secretadas e possuem uma função parácrina ou endócrina extracelular, atuando em processos como o remodelamento da matriz extracelular, potencialmente como proteases ou anti-proteolíticos, como supressor de tumor ou de genes prooncogênicos em tecidos, incluindo a próstata, e na adesão celular, durante a fecundação. Em termos gerais, as proteínas da superfamília CAP são identificadas em três ambientes: 1) como um componente

normal de uma célula ou tecido; 2) regulada durante a doença; ou 3) introduzida por um agente externo para um efeito tóxico evasivo / imune (GIBBS, et. al., 2008).

### 2.3 Isoformas do Ag 5 e abordagem proteômica

Nos estudos de Cascone et al. (1995), Pirpignani et al. (2002) e Vinzón et al, (2012), com o veneno da vespa *Polybia scutellaris rioplatensis*, o Ag 5, foi isolado e caracterizado estruturalmente. Esse alérgeno apresentou 207 resíduos de aminoácidos, dos quais 8 são resíduos de cisteína, formando 4 pontes de dissulfeto, massa molecular em torno de 23 kDa e ponto isoelétrico em torno de 9,0. Por meio da cristalografia de raio X, Henriksen e colaboradores (2001), determinaram a estrutura tridimensional do Ag 5 do veneno da vespa *Vespula vulgaris*, revelando que a mesma apresenta estrutura secundária composta por 5 hélices- $\alpha$  e 4 folhas- $\beta$ . Santos e colaboradores (2010), utilizando uma abordagem proteômica, identificaram 6 isoformas do Ag 5 no veneno da vespa *P. paulista*. A isoforma mais abundante foi extensivamente analisada por espectrofotometria de massas, tendo assim várias de suas modificações pós-traducionais determinadas. Seu modelo estrutural apresentou três hélices- $\alpha$ , uma hélice  $3_{10}$ , e quatro fólhas- $\beta$ , cobrindo 28 e 17,9% de sua sequência (Figura 3).

**Figura 1.** Modelo molecular tridimensional do alérgeno Ag 5 do veneno da vespa social *Polybia paulista*



Pela mesma abordagem proteômica e também por meio de síntese química (SPOT-synthesis) e ensaios imunológicos, Santos-Pinto et al. (2014a, b) identificaram, mapearam e caracterizaram imunologicamente os epítomos lineares de células-B de uma destas isoformas do Ag 5 presentes no veneno de *P. paulista*. Uma vez que todas as amostras de veneno foram obtidas e manipuladas na presença de um coquetel de inibidores de proteases, pode-se sugerir que as diferentes isoformas do Ag 5 do veneno de *P. Paulista* constituem moléculas naturais. Segundo estes autores, aparentemente essas isoformas poderiam ter sido originadas a partir da proteólise celular controlada da proteína intacta ou por regulação gênica (SANTOS et al., 2014).

Estes autores também determinaram uma similaridade de 99% entre o Ag 5 do veneno de *Polybia paulista* (*Poly p 5*) com o do veneno da vespa *P. scutellaris rioplatensis*, e um intervalo entre 59,3 - 93,7% de identidade com o alérgeno Ag 5 do veneno de outros vespídeos da ordem Hymenoptera.

## 2.4 Reatividade cruzada

Usualmente os diagnósticos de alergia são baseados na detecção de IgE específica ao veneno, na pele e/ou no sangue do indivíduo alérgico. No entanto, às vezes eles são dificultados por respostas falso-negativas que podem ocorrer em função da baixa quantidade de IgE detectado, pelo baixo nível de sensibilidade do teste Radioalergosorbent (RAST), ou ainda por respostas falso-positivas, devido à reatividade cruzada com alérgenos de diferentes venenos, cujos epítomos possuem conformações similares. Sendo assim, o estudo e a caracterização de diferentes componentes proteicos de venenos de insetos se torna muito importante para que seja possível a melhoria dos métodos diagnósticos, proporcionando um entendimento mais preciso, tanto dos padrões de especificidade, como de imunoreatividade cruzada entre os diferentes alérgenos (MÜLLER, 2002; MÜLLER, 2010).

A identidade entre sequências primárias, específicas do Ag 5 nas várias espécies de vespas sociais, bem como os eventos de modificações pós-traducionais (PTMS), tais como glicosilação, promovem um amplo potencial de ocorrência de reatividade cruzada em pacientes, que são alérgicos a venenos de Hymenoptera (PIRPIGNANI et al., 2002; PANTERA et al., 2003; KISCHNICK et al., 2006; KOROŠEC et al., 2012; VINZÓN et al., 2010, 2012; EBERLEIN et al., 2012; SANTOS-

PINTO, 2011; SANTOS-PINTO et al., 2014a b). O alérgeno Ag 5 de *Polybia paulista* demonstrou reatividade cruzada com os venenos da vespa *Agelaia pallipes pallipes* e da abelha *Apis mellifera*, sendo imunorreativo em todos os experimentos realizados (SANTOS, 2006).

Em amostras de soros exibindo reatividade cruzada entre venenos de abelhas e vespas, a presença de IgE contra regiões determinantes de carboidratos (CCD) ocorreu em mais de 80% das amostras positivamente testadas para ambas as espécies (CARUSO et al., 2016).

Paralelamente a estas informações e tendo-se ainda em conta o total desconhecimento sobre a função biológica desta molécula, Van Vaerenbergh e colaboradores (2013) demonstraram; por RT-PCR, a expressão de uma molécula semelhante ao Ag 5, no veneno de abelhas *Apis mellifera*, a qual denominaram de apidaecina. Além disso, confirmaram que esta molécula é expressa em diferentes tipos de tecidos, tais como nas glândulas hipofaríngeas, cérebro e no intestino médio, sendo expressa em maior abundância no cérebro. A análise comparativa dessa sequência demonstrou claramente ser paróloga às sequências de Ag 5 já descritas nos venenos de vespas (*Vespa*, *Vespa*, *Dolichovespula*, *Polistes*, *Polybia* e *Rhynchium*) e de formigas (*Pachycondyla* e *Solenopsis*).

Estudos com soros de pacientes não alérgicos a venenos de vespas, utilizando testes cutâneos (RAST- Radioallergosorbent test), demonstraram uma reatividade cruzada entre o Ag 5, presente no veneno da vespa *Dolichovespula maculata* (*Dol m 5*) e proteínas de plantas relacionadas à defesa contra patogenicidade (PRPs) causada pelo vírus mosaico do tabaco e pelo vírus mosaico do tomate (SANTOS-PINTO, 2011). Comparando-se a sequência primária de *Dol m 5* com aquelas das proteínas de defesa relacionadas à patogenicidade em plantas, verificou-se que 28% das mesmas eram conservadas. Evidentemente, ao consumir produtos à base de tomate e/ou pelo hábito de fumar, estes pacientes desenvolveram anticorpos contra as PRPs, que por sua vez apresentaram reatividade cruzada com *Dol m 5* da *Dolichovespula maculata* (KING, 1989).

Dessa forma, é inquestionável a importância do estudo da reatividade cruzada entre os venenos de insetos na prática clínica, pois estas interações possuem impacto

direto sobre o diagnóstico e a melhor conduta terapêutica a ser seguida (CASTRO et al., 2009).

## 2.5 Potencial da molécula Ag 5

Sabe-se que a reação alérgica é iniciada quando se dá a ligação do anticorpo IgE com o antígeno. Esse contato resulta na liberação de mediadores farmacológicos, tais como a histamina por mastócitos, os quais foram previamente sensibilizado, produzindo uma reação inflamatória aguda (HOLOWKA et al., 1996; MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2000). Cada antígeno pode conter um ou mais epítomos, porém somente poucos epítomos podem ativar a resposta imune, sendo estes, denominados de imúnodominantes (ABBAS, et al., 2008).

Interessante e intrigantemente, a despeito desta elevada similaridade entre as proteínas Ag 5 dos venenos de *P. paulista* e de *P. scutellaris*, o componente deste último têm sido descrito e caracterizado como uma molécula hipoalergênica (VINZÓN et al., 2010, 2012), ao contrário do que tem sido observado por ensaios da reatividade de IgE, para o mesmo alérgeno de *P. paulista* (SANTOS-PINTO, 2014a, b) e o de outras vespas como de *Vespula vulgaris* (*Ves v 5*) (KOROŠEC et al., 2012; VINZÓN et al., 2010, 2012; EBERLEIN et al., 2012).

O Ag 5 do veneno da vespa *P. Scutellaris* foi descrito por Pirpignani et al., (2002) como uma proteína variante com reduzida reatividade à IgE específica e baixa atividade anafilática. Porém, estes autores o consideram como um alérgeno importante a ser utilizado em imunoterapia de pacientes alérgicos para dessensibilização ao veneno de vespas sociais.

Devido a diversidade evolutiva das proteínas pertencentes à superfamília CAP, várias relações funcionais têm sido propostas para a proteína Ag 5, tais como a regulação do sistema imune (GIBBS et al., 2008). Em carrapatos, moscas e mosquitos (MANS et al., 2008; VALENZUELA et al., 2002), componentes Ag 5-like fazem parte de um coquetel de proteínas salivares que supostamente funcionam na supressão do sistema imunitário do hospedeiro ou na prevenção de coagulação para prolongar a alimentação (RIBEIRO, FRANCISCHETTI, 2003).

Além disso, entre as prováveis atividades biológicas do Ag 5 encontra-se a ativação celular de mastócitos pelo desencadeamento de respostas imunológicas e inflamatórias causadas por este componente. Essa ativação é um dos eventos celulares que ocorrem quando determinadas moléculas se associam aos receptores de proteínas G, por meio de dois diferentes mecanismos: (1) pelo acoplamento do antígeno (ligação cruzada) aos receptores IgE da superfície da membrana celular dos mastócitos, resultando em agregação dos receptores de alta afinidade (FcεRI) bem como a secreção de substâncias que podem ter ações efetoras, imunoreguladoras ou autócrinas. Como consequência desta ativação, temos três tipos de respostas biológicas: secreção de conteúdo pré-formado de seus grânulos, por um processo regulado de exocitose, síntese e secreção de mediadores lipídicos, além de síntese e secreção de citocinas. Estas respostas resultam da ligação cruzada de FcεRI, que inicia uma cascata de sinalização nos mastócitos, envolvendo tirosinas quinases e levando à liberação de mediadores (KINET, 1999; NADLER et al., 2000; ABBAS et al., 2008); (2) o segundo mecanismo ocorre quando peptídeos policatiônicos se ligam aos receptores de proteínas G, presentes nas membranas das células onde suas subunidades βγ estimulam a fosfolipase C, levando à liberação de mediadores (FERRY et al, 2001).

A única evidência da função biológica do Ag 5 da superfamília CAP tem sido relacionada com o efeito de uma fraca inibição da tripsina por uma proteína de 25 kDa secretada por células de glioblastoma humana (KOSHIKAWA et al, 1996). Para as demais espécies de vespas e abelhas, essa inibição da tripsina não foi relatada.

## 2.6 Expressão heteróloga do Ag 5

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 contaminação com outros componentes alergênicos e a presença de determinantes de carboidratos com reatividade cruzada (CCDs), 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 quase como um pré-

requisito para a sua caracterização detalhada e sua utilização em diversas aplicações (OLLERT, BLANK, 2015).

Por meio da aplicação de tecnologias do DNA recombinante, alguns alérgenos têm sido tradicionalmente produzidos em bactérias, mas para vários alérgenos de veneno produzidos desta forma, os epítomos conformacionais de IgE têm sido afetados devido à falta de modificações pós-traducionais apropriadas e do enovelamento correto das proteínas neste sistema procariótico. Para tais alérgenos, a produção recombinante em células eucarióticas parece ser superior em termos do enovelamento correto, glicosilação e conservação de todo o espectro de epítomos (SEISMANN et. al., 2010; BLANK et. al., 2010; OLLERT, BLANK, 2015).

O Ag 5 de diversas espécies de vespas tem sido expresso como proteínas recombinantes em ambos os sistemas procariotos e eucariotos (VINZÓN et al. 2010), tendo o potencial de fornecer grande quantidade desta molécula para uso em diagnósticos e terapias. Em geral, os alérgenos recombinantes são considerados como uma grande promessa de melhoria da imunoterapia alérgeno-específica e dos diagnósticos sensibilização alérgica *in vitro* (KISCHNICK et al., 2006).

Apesar dos avanços nos diferentes sistemas de expressão, incluindo bactérias, leveduras, células de mamíferos, e mesmo em sistemas isentos de células, a expressão de proteínas recombinantes em bactérias ainda é mais utilizada por ser de fácil manipulação, rápido crescimento e baixo custo de produção da proteína de interesse (DEMAIN, VAISHNAV, 2009; SONG et al. 2012). Por outro lado, o enovelamento das proteínas recombinantes pode ocorrer de maneira incorreta pela ausência das PTMS. Em células procarióticas, este processo não ocorre, pois a condição conformacional e a maquinaria de ligação das proteínas é diferente daquela dos eucariotos, levando a um acúmulo das proteínas expressas em agregados insolúveis (JEVSEVAR et al., 2005). Uma vez que é conhecido que as proteínas recombinantes eucarióticas necessitam de PTMS para atingirem a conformação semelhante à sua forma nativa, esses eventos podem ou não interferir na atividade imunológica do alérgeno recombinante, conforme tem sido demonstrado em muitos trabalhos (FARRELL et al., 1995)

No caso de ser demonstrado que as proteínas, e especialmente os alérgenos recombinantes, expressos em bactérias não sofreram interferência pela falta da PTMS

elas podem ser utilizadas para melhorarem o diagnóstico de IgE sorológico. Em paralelo, podem também ser utilizados outros testes tais como o de ativação de basófilos, que pode ser aperfeiçoado por meio da utilização adicional de outros alérgenos recombinantes de veneno, levando a um desenvolvimento mais confiável e eficiente de testes *in vitro* para o diagnóstico molecular de alergia (BALZER et. al., 2014).

## 2.7 Sistema de expressão – *Pichia pastoris*

As vantagens do uso de leveduras são a alta produtividade da proteína de interesse, 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). A principal desvantagem é a presença de um padrão de glicosilação diferente do que ocorre nos humanos (HINNEN et al., 1994; JUNG, WILLIAMS, 1997; TATE, GRISSHAMMER, 1996).

A levedura *P. pastoris* tem revelado excelente potencial para a expressão heteróloga, pois possibilita todas as vantagens mencionadas acima, permitindo desta forma, que altos níveis de expressão de genes heterólogos e a secreção de diferentes proteínas com importância comercial e medicinal, sejam obtidos (CEREGHINO, CREGG, 2000). Além disso, este sistema de expressão tem se mostrado como um eficiente hospedeiro para a síntese e secreção de proteínas heterólogas para aplicações acadêmicas ou industriais (COS et al., 2005).

Adicionalmente, *P. pastoris* por si só não apresenta problemas como a produção de endotoxina como ocorre com bactérias, ou contaminação viral, encontrados na expressão de proteínas produzidas em culturas de células animais. Por estas características, algumas proteínas que não podem ser expressas eficientemente em bactérias *S. cerevisiae* ou em baculovírus têm sido produzidas funcionalmente ativas com sucesso em *P. pastoris* (CEREGHINO et al., 2002).

*P. pastoris* é uma levedura pertencente ao reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Ascomycotina, classe Hemoascomycetes, ordem Endomycetales, família Saccharomycetaceae e subfamília Saccharomycetoideae. Kurtzman (2009) reclassificou esta levedura no novo gênero *Komagataella* e a dividiu em três espécies: *K. pastoris*, *K. phaffii* e *K. pseudopastoris*.

A mais notável característica fisiológica da levedura *P. pastoris* é o fato dela ser metilotrófica, ou seja, capaz de crescer em meio contendo metanol como única fonte de carbono. Isto ocorre graças à hiperexpressão de uma enzima peroxissomal chamada álcool oxidase 1 (AOX1), que pode atingir até 30% do total das proteínas intracelulares na presença de metanol (COUDERC, BARATTI, 1980).

*P. pastoris* foi desenvolvida para ser um hospedeiro excepcional para a produção de proteínas heterólogas, visto que seu promotor da AOX1 foi isolado e clonado; essa transformação foi relatada pela primeira vez em 1985 (CREGG et al., 1987; BRIERLEY et al., 1992). Esse promotor tem sido caracterizado e incorporado em uma série de vetores de expressão em *P. pastoris*.

Em *P. pastoris*, o promotor da AOX1 é rigorosamente regulado pelo metanol (COUDERC, BARATTI, 1980), o qual controla a expressão do gene que codifica a enzima AOX1, a qual catalisa o primeiro passo no metabolismo do metanol, ou seja, sua oxidação em formaldeído, utilizando oxigênio molecular. Essa enzima não é detectada em células crescidas em meio com glicose, glicerol ou etanol, mas é dramaticamente induzida quando as células são transferidas para meio com metanol (ROGGENKAMP et al., 1984). A expressão do gene AOX1 é controlada em nível de transcrição (TSCHOPP et al., 1987a; CREGG et al., 1989). Em células crescidas na presença do metanol, cerca de 5% do RNA poli (A) é derivado do gene AOX1; entretanto, em células crescidas em meio com outras fontes de carbono, o RNA mensageiro do AOX1 não é detectado (CREGG et al., 1988). Desta forma, genes heterólogos podem ser expressos em *P. pastoris* colocando-os sob controle do promotor AOX1. Isso tem se mostrado simples, fácil de ser realizado em grande escala e de custo compatível para a fermentação industrial (CREGG et al., 1993).

*P. pastoris* também abriga um segundo gene funcional de álcool oxidase para a AOX2, a qual apresenta homologia de 97%, mas com crescimento em metanol muito mais lento do que com AOX1. Esse crescimento lento em metanol permite o isolamento de cepas mutantes Mut<sup>S</sup> (Methanol utilization slow) (AOX1, AOX2) (CREGG et al., 1989; KOUTZ et al., 1989), as quais resultam da interrupção do gene estrutural AOX1. A utilização destas cepas Mut<sup>S</sup> podem resultar em uma proporção acentuada de acúmulo de proteínas heterólogas quando comparada com a linhagem Mut<sup>+</sup> (AOX1, AOX2) (FABER et al., 1995). Além disto, uma vez que o fenótipo Mut (utilização de metanol) afeta a taxa de crescimento, durante a indução, as linhagens

Mut<sup>S</sup> podem produzir altos níveis de proteínas heterólogas corretamente enoveladas, já que para isto a velocidade de enovelamento é um fator limitante.

A secreção de proteínas heterólogas por meio do sistema de *P. pastoris* é complexa e depende não apenas de fatores como dosagem do gene e do fenótipo Mut, mas também de fatores como seqüência sinal, processamento, proteólise e glicosilação, os quais afetam diretamente o rendimento e a qualidade do produto (ROMANOS, 1995).

Devido aos requisitos de estabilidade e dobramento correto da proteína, a opção de secreção para o meio de cultura é a reservada para proteínas heterólogas que são normalmente secretadas nos organismos de origem (CEREGHINO, CREGG, 2000). Entretanto, para se obter uma linhagem produtiva há necessidade de um grande esforço de investigação a fim de que os fatores que limitam a produção da proteína heteróloga possam ser controlados.

Outro fator muito importante é que, geralmente, a utilização dos códons (*codon usage*) em *P. pastoris* é semelhante à usada para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (DE SCHUTTER et al, 2009) e totalmente diferente da utilizada em bactérias ou insetos. Assim, a análise de “*codon usage*” e sua otimização são etapas essenciais para a expressão correta da proteína recombinante de interesse em *P. pastoris*.

## 2.8 Importância médica da imunoterapia contra a alergia a venenos de insetos

A imunoterapia com os extratos de veneno dos insetos sociais é um tratamento altamente eficaz e mais utilizado em pacientes com histórico de anafilaxia, com o intuito de reduzir a morbidade e a mortalidade (VINZÓN et al., 2010). A imunoterapia específica é a única forma de tratamento para as alergias do tipo I e é baseada nos resultados dos diagnósticos cutâneos e RAST, os quais confirmam a presença de IgE. O objetivo do diagnóstico é classificar o tipo de reação e identificar o inseto responsável pelo acidente, de forma a se efetuar a aplicação correta do soro ou do antígeno/alérgeno para neutralização. Entretanto, doses elevadas de veneno neste tratamento podem provocar anafilaxia e até mesmo a morte do indivíduo alérgico (CASTRO et al., 2009; PRZYBILLA, RUÉFF, 2010; VOVOLIS et al., 2010).

O risco de ocorrer ineficácia com o tratamento de imunoterapia específica com o extrato de veneno se relaciona ao aparecimento de novas reações adversas e de gravidade variável. Ao mesmo tempo, esse fato é contraditório, visto que pacientes que manifestaram reações do tipo sistêmicas e que se opuseram à imunoterapia perderam a sensibilidade na mesma proporção daqueles em tratamentos (BILÓ et al., 2005).

Uma maneira de minimizar o risco de anafilaxia durante a imunoterapia específica é a utilização de alérgenos modificados, de forma que a interação dos mesmos com a IgE seja reduzida (JUTEL et al., 2006). Outra possibilidade é a preparação de alérgenos geneticamente modificados ou derivados alergênicos de peptídeos, com atividade alergênica reduzida, o que induzirá uma interação específica do alérgeno com anticorpos IgG, os quais, competirão com a IgE pela ligação com o antígeno (LINHART et al., 2005).

Vários estudos mostram que a diferenciação diagnóstica das reações alérgicas devido à ferroadas de Hymenoptera, especialmente aquelas causadas por abelhas e vespas, ainda permanece como um campo aberto em pesquisa. Do mesmo modo, pode-se dizer que a abordagem diagnóstica realizada por meio de testes com alérgenos recombinantes em pacientes sensibilizados com venenos de vespídeos, permanece um caminho inexplorado de pesquisa, o qual é muito importante para que o conhecimento sobre este assunto seja aprimorado (CARUSO et al., 2016).

### 3 JUSTIFICATIVA

Embora no Brasil já tenham sido descritas muitas espécies de vespas da ordem Hymenoptera, bem como, a importância médica das mesmas, relacionada aos efeitos de seus venenos, ainda não existem extratos alergênicos padronizados ou componentes imunologicamente caracterizados e isolados para o tratamento e diagnóstico de alergia ao veneno de Hymenoptera. O tratamento de alergia, ao veneno destes insetos, tem sido muitas vezes realizado com extratos comerciais importados provenientes de vespas de clima temperado, o que pode elevar os riscos de anafilaxia, ao contrário de minimizá-los. Ainda outro problema importante é que a notificação de acidentes por insetos sociais no Brasil é muito negligenciada, e desta forma, os índices epidemiológicos disponíveis de acidentes com vespas são

divergentes e subestimados, fazendo com que o problema da alergia a veneno de insetos se torne uma questão de saúde pública também negligenciada em nosso país.

Por meio de clonagem e sequenciamento, duas sequências parciais de cDNA para o *Poly p 5* (GenBank GU573767 e GU562619), com 99% de similaridade com o Ag 5 da vespa *P. scutellaris* seguido por *P. exclamans* (86%), *P. annularis* (86%) e *P. dominulus* (82%), foram determinadas em nosso laboratório (GIRATTO, et al. 2010). Entretanto, a sequência de cDNA completa deste alérgeno não havia sido ainda clonada em vetor de expressão anteriormente a este trabalho.

Os resultados aqui apresentados de expressão de *Poly p 5* de *P. paulista* na forma recombinante em levedura *Pichia pastores*, indicam fortemente a sua viabilidade de utilização em diagnósticos e em imunoterapia específica, a exemplo do que tem sido relatado com o mesmo alérgeno recombinante – *Ves v 5* - do veneno da vespa *Vespula vulgaris* de clima temperado. Deste modo, estes dados representam, sem dúvida, um importante passo para o preenchimento da lacuna observada em relação à falta de extratos/alérgenos disponíveis para os procedimentos de tratamento das alergias ao veneno de vespas sociais no Brasil.

## 4 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos principais:

- A obtenção do alérgeno *Poly p 5*, na forma recombinante, mediante expressão em levedura *Pichia pastoris*, de modo a viabilizar a sua utilização no diagnóstico em pacientes alérgicos a veneno de *Polybia paulista*;
- A otimização dos protocolos de expressão, a purificação e quantificação de *rPoly p 5*.
- Verificação e comparação dos níveis de reconhecimento dos soros de pacientes, previamente sensibilizados pelo veneno de *P. paulista*, às proteínas purificadas nas formas nativa e recombinantes.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Soros de pacientes alérgicos

Os soros de 10 pacientes sensibilizados com veneno de *P. paulista*, independentemente do sexo ou idade, foram obtidos no Ambulatório de Anafilaxia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FCM-UNICAMP sob nº 1.87/2006. O consentimento foi obtido, por escrito, de todos os participantes do estudo, sendo a participação voluntária. Após a confirmação da reação intradérmica positiva ao extrato de veneno de *P. paulista*, as amostras de soro foram recolhidas e armazenadas a -80 ° C até à sua utilização. Cinco soros de pacientes não sensibilizados foram utilizados como controles negativos.

### 5.2 Coleta das amostras de *Polybia paulista*

Após criteriosa identificação morfológica de indivíduos da vespa social *Polybia paulista*, no município e arredores do município de Rio Claro- SP, foi realizada a coleta deste inseto com a utilização de um fumegador de CO<sub>2</sub>. Os insetos, ainda vivos, foram encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes (LBMA) do Departamento de Biologia-IB/UNESP/Rio Claro/SP, onde foram submetidas a analgesia à baixa temperatura (4°C), para dissecação de suas glândulas de veneno,

sendo este material imediatamente submetido à extração de RNA ou estocado a -80°C até o momento de uso.

### 5.3 Extração do RNA total

A extração de RNA total foi realizada conforme o método TRIzol (Life Technol, Cat. N° 15596) com materiais frescos obtidos logo após o momento da coleta e/ou com materiais já estocados a -85°C em TRIzol por 7 dias ou mais. Para cada reação foram utilizadas cerca de 200 glândulas de veneno de *P. paulista*, correspondentes a 200 indivíduos. As concentrações de RNA das amostras foram determinadas através da razão de absorvância em 260/280, por espectroscopia em aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare). A integridade do RNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose, conforme descrito abaixo.

### 5.4 Síntese da primeira fita de cDNA

O *pool* de RNA obtido através do método do TRIzol foi utilizado para a síntese do *pool* contendo as primeiras fitas de cDNA. A reação foi realizada por RT-PCR, mais especificamente pelo método de RACE 3' (*Rapid Amplification of cDNA 3' Ends*), com o kit Super Script da Gibco-Life Technologies, de acordo com as orientações do fabricante, porém utilizando-se o *primer* oligo dT-adapter, de seqüência: 5' GGC CAC GCG TCG ACT-AC (T)17 3', o qual se anela a todo mRNA que contenha a cauda de poli-A íntegra, dispensando-se deste modo, o passo de purificação dos mRNAs, em colunas de afinidade de oligo-dT, anteriormente à síntese de cDNA.

## 5.5 Análises Eletroforéticas

### 5.5.1 Eletroforese de RNA e DNA

Após a extração, as amostras de RNA foram sempre analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % contendo formaldeído, conforme descrito por Sambrook et al. (1989) ou ainda, em gel de agarose 1% em tampão TBE ou TAE 0,5x (H<sub>2</sub>O-DEPC). O RNA obtido foi visualizado no gel com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Cat. no. 13-15009-06\*), na proporção de 1:10 (v:v, Blue Green: amostra). As corridas foram realizadas a 50-100V contra um padrão de RNA.

Por outro lado, as análises das amostras de DNA (cDNA *pool*, produtos de PCR, extração plasmidial, reações de digestão, clonagem, etc), foram sempre submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,0 ou 1,5% em tampão TBE ou TAE 0,5x (em. H<sub>2</sub>O- MQ) a 100V. A visualização foi feita da mesma forma como descrito acima para as amostras de RNA, porém as corridas foram realizadas em paralelo com padrões de DNA, a exemplo do marcador de massa molecular de DNA "Ladder" de 1 kb (Invitrogen, 15.615-016),

Excepcionalmente, para a purificação de produtos de PCR seguido por experimentos de clonagem em vetores, as eletroforeses foram realizadas em géis de agarose de baixo ponto de fusão, na concentração de 1,5% em tampão TBE ou TAE 0,5x, a 50V. O produto de PCR foi recortado e eluído do gel por aquecimento a 65° C, ou até a fusão completa do gel e, a seguir logo utilizado nas reações de clonagem com o respectivo vetor.

### 5.5.2 Eletroforese de Proteínas

Para análise das proteínas totais provenientes de diferentes fontes (extratos brutos de veneno, frações de proteínas, nativas ou recombinantes, purificadas em colunas, proteínas extracelulares recombinantes produzidas em *Pichia pastoris*, entre outras), 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), segundo Laemmli (1970). Anteriormente às corridas, as amostras foram diluídas com tampão de amostra 2x ou 1x (no caso de precipitados protéicos), fervidas por 5 min e aplicadas nas canaletas dos géis, ao lado de um padrão de massa molecular de proteínas pré-corado (High-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences-GE Healthcare, USA) ou não, dependendo das análises posteriores a serem realizadas com o gel. Após as corridas, os géis foram corados com solução de metanol 50%, (v/v), ácido acético 10%, (v/v) e Coomassie Blue R 0,05%, durante 5 horas sob agitação a temperatura ambiente, e em seguida, descorados com a solução de metanol 5%, (v/v) e ácido acético 7% (v/v), para que as bandas proteicas pudessem ser visualizadas. Cerca de 30 a 100µg de proteínas totais, foram utilizadas nestas análises. Para detecção de quantidades menores (~ng) de proteínas nos géis, foi utilizada a coloração com prata, segundo o método de Blum et al. (1987).

## 5.6 Desenho dos *primers* gene-específicos para a amplificação do cDNA de *Poly p 5*

Para o desenho dos *primers*, listados abaixo (Tabela I), fez-se a busca de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos relativos ao alérgeno Ag 5 em venenos de vespas altamente relacionadas (*P. scutellaris*, *P. annularis* e *P. dominulus*) disponíveis no Banco de Dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e dos clones de seqüências parciais de *Poly p 5* já depositadas pelo nosso grupo (GU562619.1 e GU573767.1). As seqüências foram alinhadas pelo programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) para verificação das regiões conservadas, essenciais para o desenho do *primer* gene específico direto (Ag5 PsF), o qual, neste trabalho foi utilizado nas PCRs, juntamente com o *primer* reverso AMP inespecífico. O *primer* AMP se anela a toda seqüência do *pool* de cDNA (transcrita a partir do *pool* de mRNA), uma vez que, ao ser sintetizado, a região adaptadora (Oligo dT - adapter) se anelou especificamente a todos os mRNAs da amostra de RNA total, após a cauda poli A. O par de *primers* (Ag5 PsF e AMP) foi então utilizado para amplificar a seqüência completa do cDNA do Ag5 de *P. paulista* (*Poly p 5*) (~ 600 pb, levando-se em conta o número de aminoácidos da proteína madura).

**Tabela 1.** Seqüência de *primers* específicos.

<i>Primer</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5' – 3')	Tamanho do <i>primer</i>
Ag5 PsF	5' AATAAGTATTGTAATATCAAGTGTTCCAAG 3'	30 pb
AMP (Reverse)	5' GGCCACGCGTCTGACTAC 3'	17 pb

## 5.7 Padronização e estabelecimento das melhores condições, para amplificação por PCR, e purificação do cDNA completo de *Poly p 5*

A síntese da segunda fita de cDNA, proveniente das glândulas de veneno, foi realizada com o par de *primers* da Tabela I. Para estabelecimento das condições ideais da temperatura de anelamento, valores fixos de temperatura foram testados utilizando-se o aparelho termociclador MJ Research PT-100. Testes de gradiente de temperatura foram realizados em termociclador Eppendorf Mastercycler pró S, nos seguintes intervalos: 45°C a 55°C e 45°C a 65°C.

Após os vários testes realizados, foram determinadas as seguintes condições para as PCRs: 12,5 µL de "PCR Master Mix" (Qiagen, cod. 201443) (concentração final na reação: 0,625 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada nucleotídeo e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>); 0,4 µM de cada um dos *primers* (Ag5 PsF e AMP); 1 µL de cada cDNA (800-1000ng) de glândulas de veneno, água ultrapura para o volume final de 25 µL. Os melhores parâmetros para amplificação do cDNA completo de *Poly p 5* foram: 95°C 5min, 35x (95°C 1min, 45°C 3min, 72°C 3min) e 72°C 5min, sendo que todas as reações foram realizadas em termociclador MJ Research PT-100.

## 5.8 Clonagem em vetor pCR™8/GW/TOPO

### 5.8.1 Reação de ligação de cDNA de *Poly p 5* em vetor

Com base nos resultados obtidos, foi feita uma nova reação em maior volume (2 a 3 X o usual), sendo a banda referente ao produto de PCR gene-específico de *Poly p 5*, recortada e eluída do gel de agarose 1,5% de baixo ponto de fusão (vide item 5.5.1) e, parte deste volume foi diretamente utilizado nas reações de ligação no vetor pCR®8/GW/TOPO®, conforme sugestão do manual da Invitrogen. Para a reação de ligação foram utilizados 2 µL do amplicon de *Poly p 5* (50 ng), 1 µL do vetor pCR®8/GW/TOPO®, 1 µL de solução salina e 2 µL de água MQ sendo a mesma incubada, por 15min à temperatura ambiente, antes da etapa seguinte. Como controle da reação de ligação foi utilizado 1 µL do vetor pCR®8/GW/TOPO®, 4 µL de água MQ e 1 µL de solução salina.

### 5.8.2 Transformação em *E. coli* One Shot®

Após a reação de ligação foi feita a transformação em bactérias - *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R, quimicamente competentes, que acompanham o kit pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen). Todas as reações controles indicadas, bem como as reações experimentais, seguiram as indicações prescritas no manual do produto. A reação de transformação contendo 2 µL da reação de ligação anterior e 50 µL da suspensão de bactérias One Shot® foi incubada por 20 minutos em gelo antes do choque térmico da amostra, a 42°C por 30 segundos, seguido novamente de incubação em gelo. A cada reação, preparada em tubo eppendorff, foram adicionados 250 µL do meio SOC (0.02 g/L de triptona, 0.005 g/L de extrato de levedura e

0.0005g/L de NaCl, com adição de 0,01 M de MgCl<sub>2</sub>, 0,01M de MgSO<sub>4</sub> e 0,04% de glicose estéreis) à temperatura ambiente. O tubo eppendorff foi colocado em incubadora na posição horizontal, por 1 hora a 37° C, com agitação de 220 rpm, e a seguir, diferentes volumes desta suspensão de bactérias transformadas foram aplicadas em placas de petri. O plaqueamento das bactérias foi testado com volumes de 20 µL a 50 µL das reações diluídas, em cerca de 25 mL de meio Luria-Bertani agar (Tryptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0% pH 7,0), contendo X-gal (64 µg/mL) e espectinomomicina (100 µg/mL – Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por no mínimo 24h antes das análises.

### 5.9 Extração de plasmídeo e análise dos clones recombinantes

Dos clones recombinantes selecionados foram preparadas culturas em 3 mL de meio líquido LB contendo o antibiótico espectinomomicina a 100 µg/mL, com agitação de 225 rpm, a 37°C, durante 17 horas. As extrações de DNA plasmidial foram feitas com o kit QIAprep® Spin miniprep (Qiagen) e em seguida submetidas à análise de restrição com a enzima EcoRI-HF (New England, R3101S).

Aproximadamente 1µg (12 a 15 µL) das preparações plasmidiais foram utilizadas em reações de restrição com a enzima EcoRI-HF CutSmart (Biolabs New England, cod. R31015) num volume final de 20 µL contendo: 8 U da enzima, 2 µL do tampão EcoRI 10X e H<sub>2</sub>O MQ quantidade suficiente para (q.s.p.) 20 µL. As reações foram incubadas por 2 horas a 37°C e após esse período, analisadas em gel de agarose, conforme descrito no item 5.5.1.

### 5.10 Sequenciamento do cDNA de *Poly p 5* e análise das sequências de Banco de dados

Das preparações plasmidiais que continham o inserto, utilizou-se 25 a 200ng de cada amostra para as reações de sequenciamento com os *primers* GW1 e GW2 (Tabela II) do kit pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning®. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, UNESP – Rio Claro - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- em sequenciador Mega BACE 1000 DNA Sequencing System / Applied Biosystems 373, e a seguir, foram feitas análises das sequências obtidas através dos programas: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), BioEdit (HALL, 1999) e Multalign

(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) - de forma a checar a qualidade das sequências; obter as sequências consenso e realizar as pesquisas de similaridade entre as sequências de bases e de aminoácidos encontradas com as já descritas no GenBank.

**Tabela 2.** Sequência de *primers* do kit pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® utilizados para o sequenciamento.

<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')	Tamanho
GW 1	5' GTTGCAACAAATTGATCAGCAATGC 3'	25 pb
GW 2	5' GTTGCAACAAATTGATCAGCAATTA 3'	25 pb

### 5.11 Desenho dos *primers* para a amplificação do cDNA completo de *Poly p 5*

Após o sequenciamento do cDNA completo de *Poly p 5* foi possível desenhar os *primers* específicos do início e final da sequência, bem como, adicionar os sítios de restrições das enzimas NdeI e EcoRI a esses *primers*. Os sítios de restrição foram extremamente importantes para que ocorresse a clonagem do cDNA de *Poly p 5* de forma unidirecional e *in frame* no vetor.

**Tabela 3.** Sequência de *primers* para expressão do alérgeno *Poly p 5*.

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Sítio da enzima de restrição	Tamanho
Ag5F_Exp	5' CTTAC <u>CATATG</u> AATAAGTATTGTAATATCAAGTGTTCC 3'	NdeI	37 pb
Ag5R_Exp	5' GTAT <u>GAATTC</u> TTATTTTTTGGTGTAAATTGGTTGG 3'	EcoRI	35 pb

### 5.12 Otimização das condições de PCR com os *Primers* de expressão

Uma vez que a cada um dos *primers*, de início e final da sequência de cDNA de *Poly p 5*, foram adicionadas 10 bases nucleotídicas, houve necessidade de novo ciclo de otimização da PCR para obtenção do produto esperado. Para isto, foram testadas as enzimas Taq polimerases (a) comum (proveniente do kit Master Mix da Qiagen) e (b) enzima de alta fidelidade (Enzima High Fidelity da Thermo Scientific), a qual evita a introdução aleatória de possíveis mutações durante os ciclos da

amplificação da PCR. Para a temperatura de anelamento foi feito um gradiente de 45,1°C até 47,4°C, no aparelho termociclador Eppendorf Mastercycler pró S. As PCRs foram realizadas em volume final de 20µL, contendo 0,5 U da Taq HF ou 0,625 U de Taq DNA polimerase (kit PCR Master Mix), 200 µM de dNTPmix; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 µM de cada um dos *primers* (Ag5F\_exp e Ag5R\_exp); 2 µL de cDNA (~800ng) proveniente das glândulas de veneno. As reações foram incubadas sob as seguintes condições: Denaturação: 95°C, 5 min; 35x [Denaturação: 95°C, 1 min; Anelamento: 45,1°C até 47,4°C por 1 min; Extensão: 72°C, 3 min]; Extensão final: 72°C, 15 min.

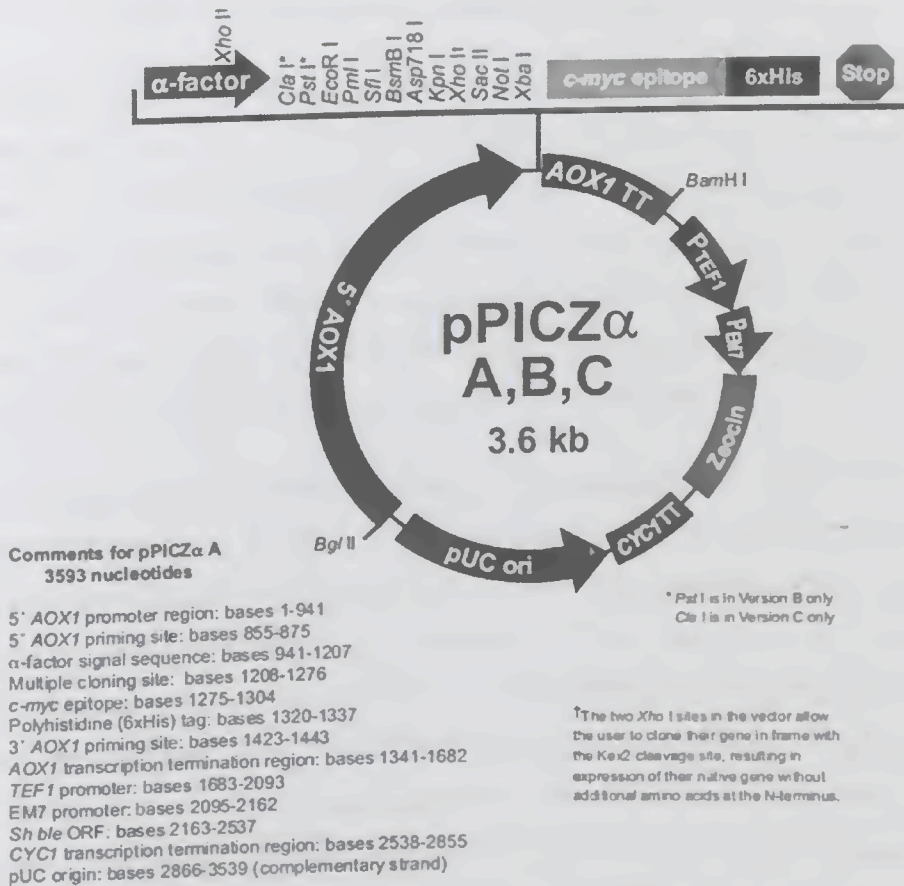
Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose de baixo ponto de fusão, em tampão TAE 0,5X, visualizados, recortados e tratados conforme item 5.5.1, a seguir utilizados para a clonagem nos vetores Topo®-GW (Invitrogen, Cat. nº K2520-20) e pGEM-T easy (Promega, USA), em acordo com as orientações dos fabricantes.

### 5.13 Síntese do gene *Poly p 5* e subclonagem em vetor de expressão de *Pichia pastoris*

A sequência completa de cDNA de *Poly p 5* foi enviada à empresa GenScript, USA, para análise de *codon usage*, síntese do gene, clonagem em vetor pUC57, subclonagem em vetor selecionado para expressão em levedura- pPICZα A (Figura 4) contendo o peptídeo sinal α-factor de *Sacharomices*, mais a cauda de histidina no N-terminal, denominada "His-Tag", para respectivamente permitir a expressão do alérgeno recombinante em meio extracelular, bem como para facilitar a sua purificação por cromatografia em coluna de afinidade de Níquel. Se necessário, a cauda de histidina pode ser removida, após a clivagem com a protease trombina.

Os clones recombinantes foram utilizados para transformação em cepa X33 de *Pichia pastoris* (X-33/pPICZαA-Ag 5), que foi escolhida por se constituir numa cepa selvagem, útil para seleção com o antibiótico Zeocina, permitindo crescimento em larga escala, tanto com o meio YPD como em meio mínimo com glicerol (BMGY).

Figura 2. Mapa dos Vetores de expressão pPICZ $\alpha$ A, B e C



Fonte: pPICZ $\alpha$  A, B, e C. *Pichia Expression Vectors for Selection on Zeocin and Purification of Secreted, Recombinant Proteins* (Invitrogen -Catalog no. V195-20).

#### 5.14 Expressão do *Poly p 5-pPICZ $\alpha$ A* em *Pichia pastoris*

A inserção da sequência de DNA de antígeno 5 de *P. paulista* no genoma da *P. pastoris* foi confirmada pela obtenção de clones recombinantes, que foram avaliados para o efeito da presença deste gene no crescimento da estirpe hospedeira. Quatro colônias foram utilizadas para a determinação da curva de crescimento e otimização da expressão.

Para a expressão da proteína, as células de *P. pastoris* X-33/pPICZ $\alpha$ A-Ag 5 foram crescidas em meio YPD-agar Yeast Extract peptone Dextrose – (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, dextrose (glicose) a 2%, agar a 2% e Zeocina a

100µg/mL), a 28 °C, durante a noite. De uma dessas placas foi selecionada uma colônia isolada para dar continuidade às etapas seguintes.

A colônia do transformante positivo foi inoculada em frasco de *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 25mL do meio BMGY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, tampão fosfato de potássio pH 6,0 a 100 mM, YNB a 1.34%, biotina a  $4 \times 10^{-5}$ %, glicerol a 1%), o qual foi denominado de pré-inóculo, para avaliação da expressão em pequena escala. As condições para essa etapa foram de temperatura de 28°C e agitação de 250 rpm, *overnight*, sendo os frascos tampados com apenas 3 camadas de gaze, pois a levedura requer muito oxigênio para crescer.

As células foram recolhidas quando a  $DO_{600nm}$  atingiu valores entre 4 - 6 por meio de centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 25 mL de H<sub>2</sub>O estéril. Esse processo de lavagem foi repetido por mais 2 vezes. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 100 mL do meio BMMY (mesmo meio acima, apenas substituindo-se o glicerol por 1,0 % de metanol) e colocadas em *Erlenmeyer* aletado de 1000 mL. Para a indução da expressão de *rPoly p 5* uma amostra inicial, correspondente ao tempo de "zero hora" ( $T_0$ ) foi retirada, e ao restante da suspensão foi adicionado o indutor - metanol a uma concentração final de 1%, a cada 24h, durante 5 dias ( $T_{120}$ ), incubando a cultura a 28°C, com agitação de 250 rpm. Para o controle negativo, foram seguidos os mesmos procedimentos de indução, porém utilizando-se uma cultura proveniente de um clone de *P. pastoris* transformado com o vetor pPICZαA vazio. A cada 24 horas e logo antes da adição do indutor, foram sempre recolhidas duas alíquotas - 100 µL e 2 mL- de cada cultura.

As alíquotas de 100 µL foram imediatamente utilizadas para o acompanhamento do crescimento da cultura pela leitura da  $DO_{600nm}$  (em diluições seriadas em H<sub>2</sub>O, quando necessário), até que a mesma atingisse a fase estacionária do crescimento. Por outro lado, as alíquotas de 2 mL de cada cultura (experimental e controle) em cada 24h do tempo de indução foram processadas e congeladas para posteriormente serem analisadas em conjunto por SDS-PAGE. Para isso, logo após a coleta, cada alíquota (controle ou experimental) foi inicialmente centrifugada em baixa velocidade (3.000xg) por 5 minutos, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante recolhido e mantido a -20°C até o tempo final da indução, em que todas

as alíquotas já haviam sido retiradas, processadas e congeladas. Do mesmo modo como foi realizado para as alíquotas de 2mL, após o período final de indução ( $T_{120}$ ), as culturas foram transferidas para tubos Falcon de 50mL, submetidas ao mesmo processo de centrifugação, tendo seus sobrenadantes recolhidos para análise da expressão e/ou purificação da proteína expressa por SDS-PAGE.

#### 5.14.1 Precipitação de proteínas totais e análise em SDS-PAGE

De cada uma das alíquotas de 2 mL (de cada tempo), foram coletados 1mL, aos quais foram adicionados  $\frac{1}{4}$  do volume (250uL) de TCA 100% (ácido tricloroacético) gelado. Os tubos (Eppendorf) foram incubados a 4°C ou diretamente em gelo por 2 horas ou *overnight*. A seguir, foram submetidos à centrifugação por 30 minutos a 13.000 rpm (em Centrífuga de bancada Eppendorf 5415 R). Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados 2 vezes por centrifugação (13.000 rpm, 15 minutos por vez a 4°C) com acetona a 100%, gelada. Após um terceiro passo de centrifugação para remoção da acetona, nestas mesmas condições, os tubos foram deixados abertos e invertidos para baixo, para completa evaporação da acetona.

Os precipitados foram diretamente ressuspensos em tampão de amostra SDS-PAGE 1x, fervidos por 5min e aplicados em canaletas de géis SDS-PAGE 12 %, conforme descrito no item 5.5.2.

#### 5.15 Purificação rPoly p 5 de *P. pastoris*

Primeiramente o rPoly p 5 ( $T_{120}$ ) passou por filtrações sequenciais em membranas (Standard MF-Millipore Membranes) de 0.45  $\mu\text{m}$  e 0.22  $\mu\text{m}$ , respectivamente, para a retirada dos resíduos celulares. Após a filtração, a amostra foi concentrada utilizando filtros Amicon (Ultra-15 Centrifugal Filter Units) de 10 kDa e ressuspensa em 10 mL do tampão Na/PO<sub>4</sub> (0,02 M) pH7,4 contendo NaCl 0,5 M. A purificação do rPoly p 5 expresso em *P. pastoris*, foi obtida por cromatografia de afinidade em resina de Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA-Agarose) seguindo o protocolo do fabricante (Protocol 14, The QIAexpressionist, Qiagen, Germany) em que foram utilizados os seguintes tampões, todos a pH 7,4: (i) Tampão de lavagem (50 mM Na/PO<sub>4</sub>, 300 mM de NaCl e 20 mM de Imidazol); (ii) Tampão de eluição (50 mM Na/PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 75 mM de Imidazol). O único parâmetro de diferenciação dos tampões do protocolo

original consistiu na concentração final de imidazol, desde a calibração da resina até a eluição da proteína. Após a purificação da proteína expressa com "His-tag", foi realizada uma análise das frações eluídas desta coluna, por SDS-PAGE 12%, as quais foram em seguida, submetidas à cromatografia de ultrafiltração (exclusão molecular em coluna Sephadex G-100).

A purificação foi conduzida pelo acoplamento da coluna de Sephadex G-100 (90 x 2,5 cm) no aparelho ÄKTA-FPLC. A coluna foi calibrada com tampão de acetado de amônio a 5 mM, pH 6,8, sendo as frações coletadas a um fluxo de 1 mL/min em volume de 1 mL. O. A absorvância a 280 nm e a condutância foram monitoradas. As amostras dos *pools* dos picos de absorvância a 280 nm foram aplicadas em SDS-PAGE a 12% para verificar em quais dos picos encontrava-se a proteína de interesse.

#### **5.16 Purificação do antígeno 5 nativo de *P. paulista* (nPoly p 5)**

O veneno bruto e liofilizado (23 mg de proteínas totais) de *Polybia paulista* foi solubilizado em tampão de acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e logo em seguida submetido a cromatografia de troca catiônica numa coluna de Hiprep FF CM (16 x 10 mm, 20 mL, GE Healthcare) calibrada com o mesmo tampão e acoplada em um sistema Akta-FPLC, com um fluxo de 2 mL / min. A eluição foi realizada por um gradiente linear de 0 -1 M NaCl. Frações de 5 mL foram recolhidas e a eluição foi monitorada pela medida da absorvância a 280 nm.

#### **5.17 Dosagem de proteínas totais**

As frações de proteína e dos alérgenos purificados nativos e/ou recombinantes foram quantificados utilizando o método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino (Sigma, EUA) como padrão (SEDMAK, GROSSBERG, 1977).

#### **5.18 Imunodeteção por Western Blot**

Os soros de 10 pacientes alérgicos ao veneno de *P. paulista* foram selecionados ao acaso, para serem avaliados quanto à presença e o reconhecimento de IgE específica à proteína rPoly p 5. Para esta análise, 80 µg dessa proteína, bem como a mesma quantidade da proteína nPoly p 5 e 80 µg de proteínas totais do extrato

de veneno bruto da vespa em estudo foram submetidos à corrida em SDS-PAGE 12 %, ao lado do um padrão de massa molecular de proteínas pré-corado (item 5.5.2)

As proteínas submetidas a SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,22 mm utilizando um sistema semi-seco (TransBlot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, EUA) e a eficiência de transferência foi avaliada por coloração do gel com Coomassie Blue G-250 (Sigma, EUA). Antes da adição do soro de pacientes, as membranas foram bloqueadas com Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, com Tween-20 a 0,5% (Sigma Aldrich, EUA) (solução de lavagem TBS-T) e 3% de leite desnatado (solução em bloqueio).

O procedimento de bloqueio da membrana foi realizado durante 1 h de incubação à temperatura ambiente sob agitação lenta, num agitador de plataforma Rocker II™ (Boekel Scientific, EUA). Após a lavagem (3 vezes com TBS-T), as membranas foram transferidas para um miniaparelho PROTEAN® II (Bio-Rad, EUA). Quatrocentos microlitros de soro de cada paciente (diluído a 1:50 numa solução de TBS-T com 1% de leite desnatado) foram transferidos para as canaletas individuais do aparelho. O sistema, contendo a membrana e as amostras de soro, foi incubado durante a noite à temperatura ambiente sob agitação lenta num agitador de plataforma Rocker II™. A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpo anti-humano de IgE (3-cadeias específicas) conjugado com peroxidase (Sigma, Aldrich, EUA) diluído a 1:5000 (TBS-T e 1% de leite desnatado) e as bandas foram visualizadas em Image Quant 400 (GE Healthcare, Suécia) utilizando o substrato quimioluminescente Luminata™ Forte Western HRP substrato (Millipore, EUA).

#### **5.19 Detecção de rPoly p 5 – “Anti-His Selector Kit”**

Para a detecção das variantes recombinantes do antígeno 5 de veneno de *P. paulista* foi utilizado o sistema comercial “Anti-His Antibody Selector Kit” (Qiagen, USA) usando as indicações do fabricante. O *Western blot* foi realizado seguindo o descrito no ítem acima com pequenas modificações. Após a etapa de bloqueio, a membrana, contendo o alérgeno, foi incubada com o anticorpo Penta-His (fornecido pelo kit), por uma hora, a temperatura ambiente, sob agitação em plataforma Rocker II™ (Boekel Scientific, USA). A membrana foi lavada e incubada com anticorpo *rat*

*anti-mouse* IgG (subclasse IgG1) conjugado a HRP. O revelado foi realizado segundo descrito anteriormente (item **5.18**).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de extratos de venenos brutos no diagnóstico de alergia ao veneno de Hymenoptera tem desvantagens associadas à ocorrência de reatividade cruzada e reações sistêmicas adversas, além de elevados custos. A obtenção de alérgenos do veneno na forma recombinante, seu emprego no diagnóstico e o tratamento de pacientes constituem uma alternativa viável e interessante sendo que o(s) componente(s) em estudo passam a ser completamente caracterizados e sem a presença de contaminantes ou outros compostos alergênicos interferentes.

A primeira etapa para obtenção dos alérgenos de veneno de vespas por via recombinante foi a obtenção de RNA total de ótima qualidade. Esta etapa foi realizada seguindo-se protocolos que impediram a degradação do material genético, particularmente o RNA. Devido a elevada presença de RNAses nas amostras biológicas, foram empregados materiais estéreis e tratados com DEPC (dietil pirocarbonato), um potente inibidor de RNAses. Para aumentar ainda mais os níveis de RNA extraído e visando a clonagem e o sequenciamento de cDNA do *Poly p-5*, neste trabalho o RNA total foi obtido a partir de glândulas de veneno das vespas. Assim, as glândulas de veneno recém dissecadas foram maceradas em Trizol (Invitrogen) e logo manipuladas de acordo com o protocolo do fabricante ou, incubadas por 48 horas ou mantidas congeladas a  $-85^{\circ}\text{C}$  até por 7 dias no mesmo reagente, antes do procedimento de extração propriamente dito, o que aumentou a eficiência de inibição das RNAses e o rendimento do RNA extraído.

### 6.1 Obtenção, dosagem e análise de RNA total em gel de agarose

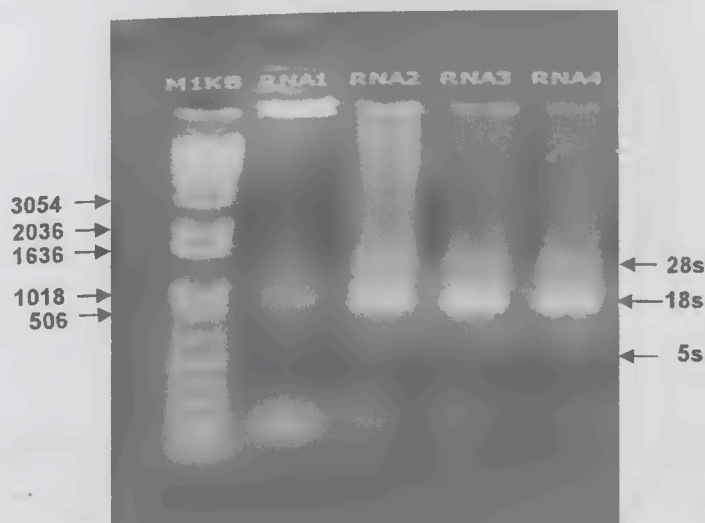
O aparelho de NanoVue Plus<sup>TM</sup> foi utilizado para obter a concentração de RNA total nas amostras, bem como para checar a pureza dos materiais por meio das razões de absorbância 260/280nm e 260/230 que medem, respectivamente, a relação entre a quantidade de ácidos nucleicos (medida de Abs 260 nm)/proteínas (medida de Abs 280 nm), bem como a relação entre a quantidade de ácidos nucleicos (medida de Abs 260nm)/peptídeos e fenol (medida de Abs 230nm). Por estas relações, uma boa amostra de RNA sem contaminantes de proteínas, peptídeos ou fenol, deve apresentar valores próximos de 2,0 para a primeira e entre 1,8 e 1,9 para a segunda relação. Na **Tabela 4** temos os valores obtidos para as relações de Abs 260/280 e de

Abs 260/230 nm de 4 amostras de RNA total obtidas de glândulas de veneno de *P. paulista*. Verifica-se nesta tabela, que a amostra RNA2 apresentou uma maior concentração do ácido nucleico entre elas, porém todas as demais amostras também apresentaram o RNA bem purificado e de ótima qualidade, conforme pode ser também visualizado na **Figura 5**.

**Tabela 4.** Valores obtidos para as concentrações e razões de Absorbância, para amostras de RNA total extraídos de glândulas de veneno de vespas *P. paulista*. (\*). Representa a amostra com maior concentração e grau de pureza em todas as relações de Abs.

Amostras	Concentração (ng/μl)	(Abs) 260/280	(Abs) 260/230
RNA1	1251	2.022	1.681
RNA2	1989*	2.089*	1.933*
RNA3	1716	2.068	1.924
RNA4	1778	2.024	1.849

**Figura 3.** Perfil eletroforético obtido em gel de agarose a 1,5% em TAE- DEPC 0,5x para amostras de RNA total. Da esquerda para a direita (**M1kb**) refere-se a um padrão de DNA ladder de 1kb (Invitrogen - cod. 15615-016) **RNA1, RNA2, RNA3 RNA4**, Amostras de RNA total extraído de glândulas de veneno; **28s, 18s e 5s** correspondem aos valores descritos para os RNAs ribossomais. Os rastros em cada canaleta representam os mRNAs, os snRNAs, tRNAs e todos os demais RNAs presentes nas células. As amostras foram coradas com Blue Green 4μL/ 6 μL amostra.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6.2 Obtenção e análise do *pool* de cDNA

Conforme mencionado, a primeira fita de cDNA foi sintetizada com o *primer* oligo dT-adapter, de sequência 5' GGC CAC GCG TCG ACT AC (T)<sub>17</sub> 3'. Pelo fato das moléculas de mRNA possuírem uma cauda de poli A no final 3', este *primer* além

de se anelar a região poli A, adiciona também a sequência adaptadora 5' GGC CAC GCG TCG ACT AC 3', a qual servirá para o anelamento do *primer* AMP, nas reações de PCR posteriores. O cDNA sintetizado é denominado *pool* de cDNA por que o *primer* oligo dT-adapter se anela especificamente a toda molécula de RNA mensageiro da amostra de RNA total extraída das glândulas do veneno de *P. paulista*.

Na **Figura 6** estão apresentados os perfis eletroforéticos de várias reações de transcrições reversas com diferentes volumes dos RNAs 2, 3 e 4 para a síntese do *pool* de cDNA.

**Figura 4.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5%, do *pool* de cDNA sintetizado a partir dos RNAs totais 2, 3 e 4 da Tabela 2 A canaleta 1 refere-se ao padrão de DNA ladder de 1kb (Invitrogen - cod. 5615-016). As canaletas 2- 4 representam o produto das reações realizadas com 0,5ug de RNA e 5-7 reações com 1 ug de RNA. Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green (4µL/ 6 µL de amostra).



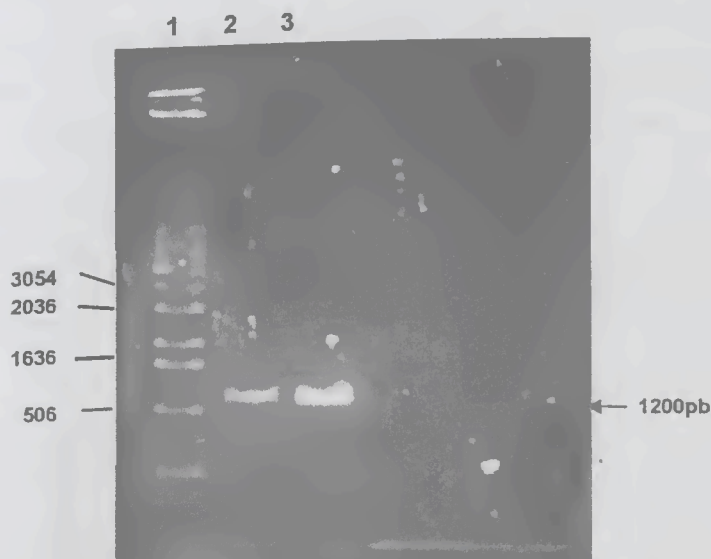
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 6.3 Amplificação do cDNA de *Poly p 5* por PCR gene-específico

Para estes experimentos foram utilizados os *primers* - "direto Ag 5 gene-específico" o qual foi denominado Ag5 PsF por ter sequência de bases idêntica à do mesmo alérgeno Ag5 do veneno da vespa *Polybia scutellaris* e o *primer* "reverso AMP". O tamanho teórico previsto para o fragmento amplificado era de 621 pb, levando-se em conta que a proteína alergênica *Poly p 5* apresenta 207 aminoácidos (SANTOS-PINTO et al., 2014a).

Inicialmente, foram realizados vários experimentos para otimização das PCRs, tais como misturas de reação para a PCR, concentrações dos *primers* e do cDNA, sendo as melhores condições estabelecidas com o kit Master Mix da Qiagen 0,4  $\mu$ M de cada um dos *primers* (Ag5 PsF e AMP),; 800 a 1000ng de cDNA e temperatura e tempo de anelamento de 45°C e de 3 minutos, respectivamente, conforme descrito no item 5.7. Desta forma, pudemos obter a amplificação de uma única e intensa banda de ~1200 pb (**Figura 7**).

**Figura 7.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5x, da banda de cDNA obtida por PCR gene-específico. A canaleta 1 refere-se ao padrão de DNA ladder de 1kb (Invitrogen - cod. 15615-016). Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green (4 $\mu$ L/ 6  $\mu$ L de amostra). (2 e 3) – cDNA de glândulas de veneno em diferentes quantidades.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora este valor represente o dobro do valor esperado quando a análise é feita por eletroforese em gel de agarose, a real confirmação do tamanho desta molécula foi somente possível após o seu sequenciamento. A partir destes resultados foram realizadas PCRs em maiores volumes e a clonagem dos fragmentos obtidos em vetor Topo GW, específico do kit pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® TA.

#### 6.4 Seleção dos clones recombinantes de *Poly p 5*, extração plasmidial e análise por digestão.

Dos experimentos de clonagem do fragmento de cDNA amplificado de 1200pb, foram obtidos um total de 5 colônias em todas as placas. Destas colônias foi

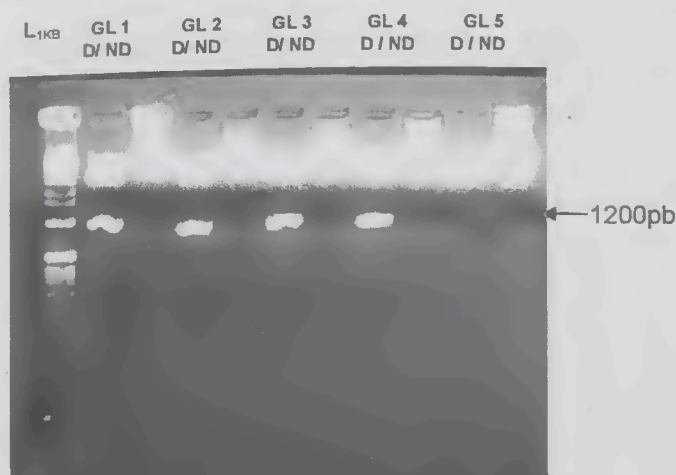
inicialmente extraído o DNA plasmidial (minipreps) e determinada a concentração dessas preparações através da razão de Abs 260/280 nm em NanoVue Plus™, conforme apresentado na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Concentrações para as preparações plasmidiais dos clones analisados.

Amostras de Clones Recombinantes com Inseto de ~1200pb	Concentração ng/uL
GL 1	83,0
GL 2	85,0
GL 3	78,5
GL 4	75,0
GL 5	68,0

Estas amostras foram submetidas a análise de restrição com a enzima *Eco* RI, a fim de verificar quais delas realmente apresentavam o inserto de interesse. Dessa análise verificamos que das 5 colônias, quatro eram recombinantes, conforme pode ser verificado na **Figura 8**. O clone GL5 não apresentou nenhum inserto, diferentemente dos demais clones.

**Figura 8.** Resultado da análise de restrição com *Eco* RI das preparações plasmidiais da **Tabela 5**, realizado em gel de agarose 1.5 %, com tampão TAE 0,5X. **L1kb**: DNA ladder de 1kb (Invitrogen - cod. 15615-016); **D** e **ND** correspondem respectivamente aos plasmídeos digeridos e não digeridos com a enzima. Verificar a presença do inserto tamanho aparente de 1200pb em GL1, GL2, GL3 e GL4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6.5 Sequenciamento, análise das sequências e desenho dos *primers* específicos de expressão

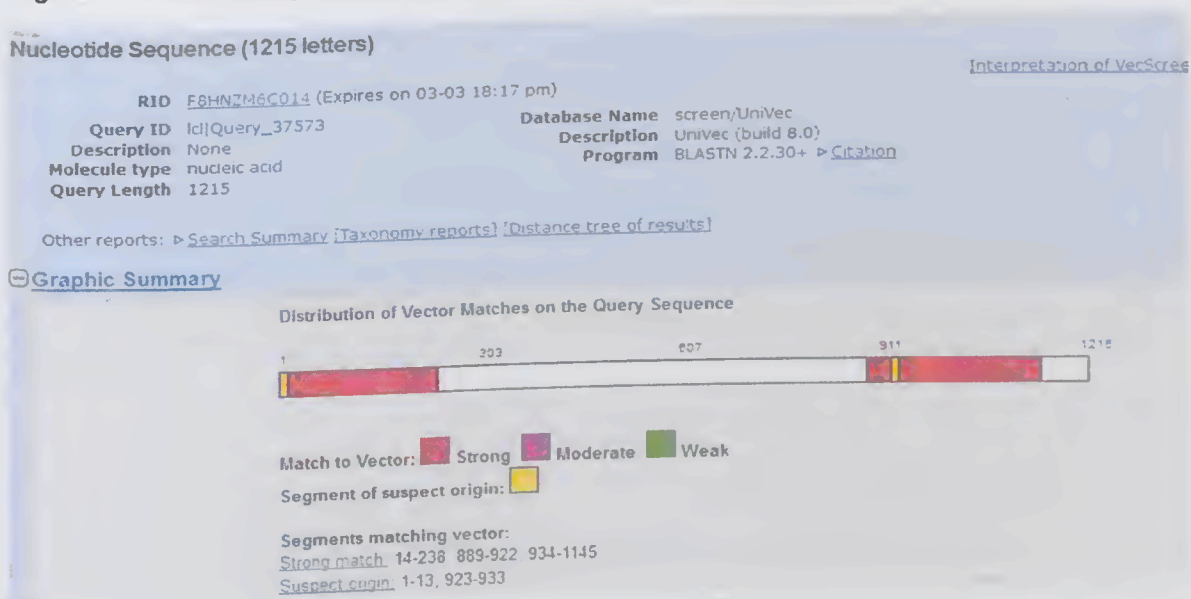
A seguir, essas amostras foram sequenciadas, de acordo com Material e Métodos (item 5.10), sendo que, para a obtenção da sequência completa do cDNA de *Poly p 5* foram necessários vários experimentos de sequenciamento (em dois laboratórios diferentes), nos quais foram utilizadas diferentes quantidades (100ng, 200ng e 500-1000ng) de DNA das preparações plasmidiais acima e diferentes concentrações dos *primers* GW1 e GW2 da Tabela 2. Os melhores resultados foram obtidos utilizando uma maior concentração (500 a 1000ng) de cada uma das preparações e 3,2 pmoles de cada *primer* citado acima. Da análise das sequências ainda brutas (incluindo parte do vetor) proveniente das glândulas de veneno foi obtida uma sequência consenso de 1215pb, a qual encontra-se a seguir:

Consenso de todas as sequências com o Vetor (**Vetor** + inserto, **em amarelo**)

1215bp

```
>TTCTGTCCTTGTTAGAGGAGGCATGATGATATATTTTTATTTGCAATGTAACATCAGAGATTTGAG
ACCGGGCCAGAGCTGCCAGGAAACAGCTATGACCATGTAATCGACTCACTATAGGGGATTGAGCTGGA
TGGCAAATAATGATTTTTATTTGATGATAGTGACTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATTATTTT
TTATAATGCCAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCAATTTCGCCCTTAATAAGTATTGTAATATCAAGT
GTTCCAAGGTTGCCCATACAGTCTGCCAATATGGAGAATCAACAAAACCAAGCAGTAAATGTAATAAA
GTAAGCATCACATCCGTTGGTGTAAACGGAAGAAGAGAAAAAATTAATCGTAGACGAGCATAATCGATT
TAGACAAAAAGTTGCACAGGGGTTGGAAACCAGAGGTAATCCTGGACCACAGCCTGCTGCTTCGGACA
TGAATAATTTGGTATGGAACGATGAATTAGCTTATATCGCACAAAGTATGGGCCAGCCAATGCCAATTT
TTTGTTACGACAAATGCAGGAATACCGCACAAATATCAAGTTGGACAAAATATAGCGTATTCAGCGAG
CACCGCTGCGTACCCAGGTATTGTCAGTCTAATCGTACTCTGGGAAAACGAAGTAAAGATTTTAACT
ATTCTCAAGGAATAACAAAAGAGAAGCTTTCTAAAGTCGGCCATTACACTCAAGTGGTTTGGGCTAAA
ACTAAGGAAGTGGGTTGTGGATCTATCAAATATATTGAAAAAGGTATGAAAAGCCATTACCTTGTATG
TAATTATGGACCAGCTGGAAATTACATGGGCCAACCAATTTACACCAAAAAATAATTAATTATTTAAT
ACGCCAAAAAAGTAGTTCGACGCGTGGCCAAGGGCGAATTCGGAGCCTGCTTTTTTGT
ACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCCTATCAGTCAA
AATAAAATCATTATTTGGGGCCCAGCTTAACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAC
ATCCATGCTACGTTAACGCGAGAGTAGGAAGTCCCATCAAATAAAACGAAAGGCTCATCGGAAATGG
GCTTCTTTATCGTGTGTTGTCGGGATCTCTGAAAACCGGGACGATTTGAACTTAACAGAGG
```

**Figura 9.** Análise da sequência cDNA consenso, ainda com a presença de fragmentos do vetor.



Fonte: Elaborado pelo autor.

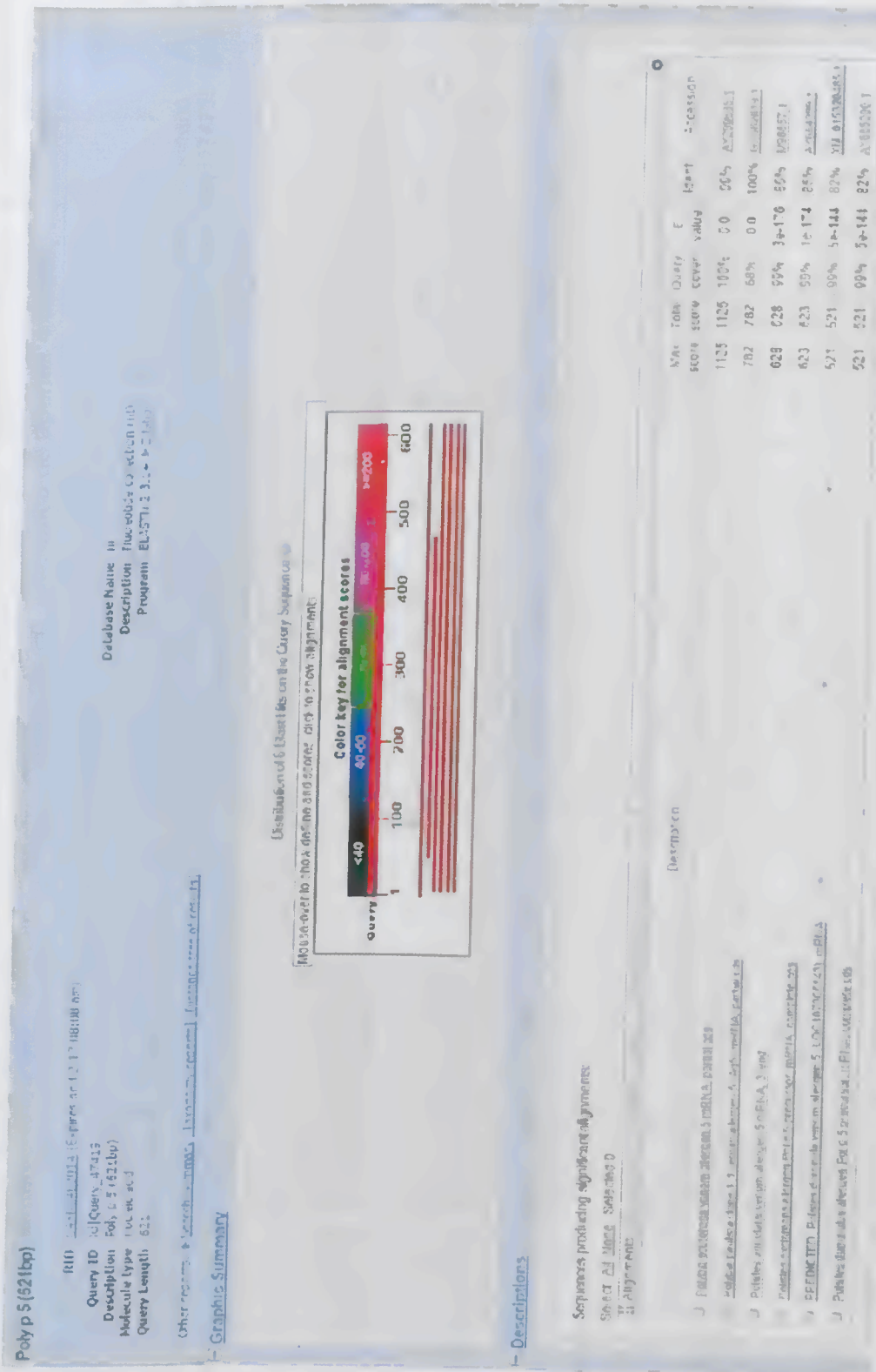
A partir da retirada da sequência do vetor TOPO GW e análise de Blast, obtivemos a sequência consenso para o cDNA completo de *Poly p 5* contendo 621 pb. Da análise de Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e do alinhamento (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/result/1425296581.gif>) com as sequências do mesmo alérgeno do veneno das vespas *Polybia scutellaris* (gi|31747351|gb|AY299635.1), *Polistes annularis* (gi|160779|gb|M98857.1), *Polistes dominulus* (gi|51093376|gb|AY685000.1) e com as nossas sequências parciais, previamente determinadas para o *Poly p 5* (gi|290792374|gb|GU562619.1) *P. paulista* clone 1.3 venom allergen e gi|290795733|gb|GU573767.1) *P. paulista* clone 2.4 venom allergen), verificou-se a existência de uma alta similaridade entre elas (**Figura 10**), sendo de 99% entre *Poly p 5* e o mesmo alérgeno do veneno de *Polybia scutellaris* e de 85%, entre *Poly p 5* e as moléculas de *Polistes annularis* e *Polistes exclamans*.

**Sequência Consenso sem o Vetor (Sequência completa 5'- 3') após análise de Blast e Alinhamento**

**>Poly p 5 (621bp)**

AATAAGTATTGTAATATCAAGTGTTCCAAGGTTGCCCATACAGTCTGCCAATATGGAGAATCAACAAA  
ACCAAGCAGTAAATGTAATAAAGTAAGCATCACATCCGTTGGTGTAACGGAAGAAGAGAAAAAATTAA  
TCGTAGACGAGCATAATCGATTTAGACAAAAAGTTGCACAGGGGTTGGAAACCAGAGGTAATCCTGGA  
CCACAGCCTGCTGCTTCGGACATGAATAATTTGGTATGGAACGATGAATTAGCTTATATCGCACAAAGT  
ATGGGCCAGCCAATGCCAATTTTTTGTTCACGACAAATGCAGGAATACCGCACAAATATCAAGTTGGAC  
AAAATATAGCGTATTCAGCGAGCACCGCTGCGTACCCAGGTATTGTCAGTCTAATCGTACTCTGGGAA  
AACGAAGTGAAAGATTTTAACTATTCTCAAGGAATAACAAAAGAGAACTTTTCTAAAGTCGGCCATTA  
CACTCAAGTGGTTTTGGGCTAAACTAAGGAAGTGGGTTGTGGATCTATCAAATATATTGAAAAAGGTA  
TGAAAAGCCATTACCTTGTATGTAATTATGGACCAGCTGGAAATTACATGGGCCAACCAATTTACACC  
AAAAAATAA

**Figura 10.** Resultado de Blast para a sequência de nucleotídeos do alérgeno de veneno de *Polybia scutellaris*, *Polistes annularis*, *Polistes exclamans* e *Polistes dominulus*.



Fonte: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)



A partir de então, a sequência de cDNA de *Poly p 5* foi submetida à análise de ORF Finder (Open Reading Frame Finder; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>), sendo o quadro de leitura encontrado no *frame +1* (**Figura 12**). Além disto, foi também submetida para depósito no GenBank (GenBank: KU558986.1).

**Figura 12.** Análise de Orf Finder da sequência de cDNA completa de *Poly p 5*

```

1 AATAAGTATTGTAATATCAAGTGTTCCAAGGTTGCCCATACAGTCTGCCAATATGGAGAA
  N K Y C N I K C S K V A H T V C Q Y G E
61 TCAACAAAACCAAGCAGTAAATGTAATAAAGTAAGCATCACATCCGTTGGTGTAACGGAA
  S T K P S S K C N K V S I T S V G V T E
121 GAAGAGAAAAAATTAATCGTAGACGAGCATAATCGATTTAGACAAAAAGTTGCACAGGGG
  E E K K L I V D E H N R F R Q K V A Q G
181 TTGGAAACCAGAGGTAATCCTGGACCACAGCCTGCTGCTTCGGACATGAATAATTTGGTA
  L E T R G N P G P Q P A A S D M N N L V
241 TGGAACGATGAATTAGCTTATATCGCACAAAGTATGGGCCAGCCAATGCCAATTTTTTGT
  W N D E L A Y I A Q V W A S Q C Q F F V
301 CACGACAAATGCAGGAATACCGCACAATATCAAGTTGGACAAAATATAGCGTATTCAGCG
  H D K C R N T A Q Y Q V G Q N I A Y S A
361 AGCACCGCTGCGTACCCAGGTATTGTCTAGTCTAATCGTACTCTGGGAAAACGAAGTGAAA
  S T A A Y P G I V S L I V L W E N E V K
421 GATTTTAACTATTCTCAAGGAATAACAAAAGAGAACTTTTCTAAAGTCGGCCATTACACT
  D F N Y S Q G I T K E N F S K V G H Y T
481 CAAGTGGTTTGGGCTAAAAC TAAGGAAGTGGGTTGTGGATCTATCAAATATATTGAAAAA
  Q V V W A K T K E V G C G S I K Y I E K
541 GGTATGAAAAGCCATTACCTTGTATGTAATTATGGACCAGCTGGAAATTACATGGGCCAA
  G M K S H Y L V C N Y G P A G N Y M G Q
601 CCAATTTACACCAAAAAATAA 621
  P I Y T K K *

```

Fonte: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>).



A estrutura primária e os aspectos imunológicos do Ag 5 de veneno de espécies de vespas endêmicas do hemisfério norte têm sido amplamente estudados. Estes estudos relataram que a identidade entre as sequências de Ag 5 em espécies do mesmo gênero é de aproximadamente 98%, enquanto que entre os diferentes gêneros, como *Vespula* e *Polistes*, este valor é de aproximadamente 57%, ou seja, a similaridade dessa proteína entre as vespas segue um padrão filogenético, de acordo com o grau de parentesco e o nível de homologies entre as sequências, desde que, quanto maior a similaridade, maior o grau de reação cruzada (PADAVATTAN, et al., 2008).

Na verdade, de acordo com a lista de alérgenos da “*International Union of Immunological Societies*” (IUIS), o Ag 5 foi descoberto em quase todas as espécies dos gêneros *Vespidae* e para alguns deles, parece ser o único alérgeno de veneno conhecido. Além disso, no veneno das espécies de formigas “lava-pés” do gênero *Solenopsis* (*Solenopsis invicta*, *Sol i 3*; *Solenopsis richteri*, *Sol r 3*; *Solenopsis saevissima*, *Sol s 3*), também foi relatado um alérgeno majoritário com forte semelhança com o alérgeno Ag 5 de *Vespidae* (VAERENBERGH et al., 2013).

Contudo, até o momento, nenhum estudo demonstrou IgE relacionada à atividade cruzada entre o Ag 5 de *V. vulgaris* e *Sol. i 3* (alérgeno de *Solenopsis invicta* similar ao Ag 5), os quais apresentam 44% de similaridade da sequência de aminoácidos (PADAVATTAN, et al., 2008). O fato das proteínas homólogas de Ag 5, encontradas em venenos de formigas “lava-pés”, não exibirem reatividade antigênica cruzada com a mesma proteína em veneno de vespídeos é um resultado consistente com baixo grau de conservação da estrutura proteica e do comprimento dos *loops* nestes alérgenos. Entretanto alguma reatividade cruzada tem sido observada entre os Ag 5 de vespídeos e as moléculas homólogas de outros animais, com as proteínas das famílias das CRISP (HOFFMAN, 2006). Müller et al. (2008) também observaram reatividade cruzada em soro humano, entre os alérgenos de veneno Ag 5 da *V. vulgaris* e as proteínas do testículo de mamíferos pertencentes à família das proteínas secretoras ricas em cisteínas (hCRIsp).

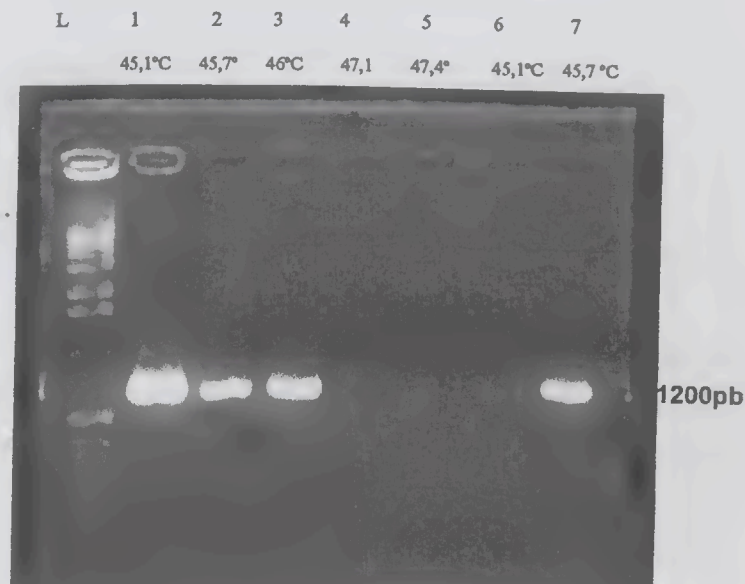
Devido à elevada similaridade de sequência entre as moléculas de Ag 5 das várias espécies de vespas, foi possível desenhar os *primers* de expressão (direto e

reverso) com sítios das enzimas de restrição - NdeI no terminal 5' e de EcoRI no terminal 3', respectivamente, conforme demonstrado na **Tabela 3**.

### 6.6 Otimização das reações de PCR para obtenção e amplificação da sequência de cDNA de *Poly p 5* a ser clonada em vetor de expressão

Para estes experimentos foram utilizadas preparações plasmidiais do clone GL2 e testadas as enzimas Taq High Fidelity e a mistura de reação Master Mix da Qiagen, somente no intervalo de temperatura de anelamento de 45 a 47,5°C, por 1 min, mantendo-se as demais condições iguais às estabelecidas anteriormente, ou seja: 95°C 5min, 35x (95°C 1min; 45°C-47,5°C 1min, 72°C 3min) 72°C 15min, 4° ∞. Nestas condições, as temperaturas de anelamento geradas no aparelho Termociclador de Gradiente Eppendorf pró S, foram as seguintes: 45,1°C; 45,7°C; 46°C; 47,1°C e 47,4°C. Desta forma, na **Figura 14** pode se observar que houve excelente nível de amplificação de uma única banda com as duas enzimas utilizadas na temperatura de 45,7°C, e que a enzima de alta fidelidade permitiu também a amplificação nas temperaturas de 45,1°C e 45,7°.

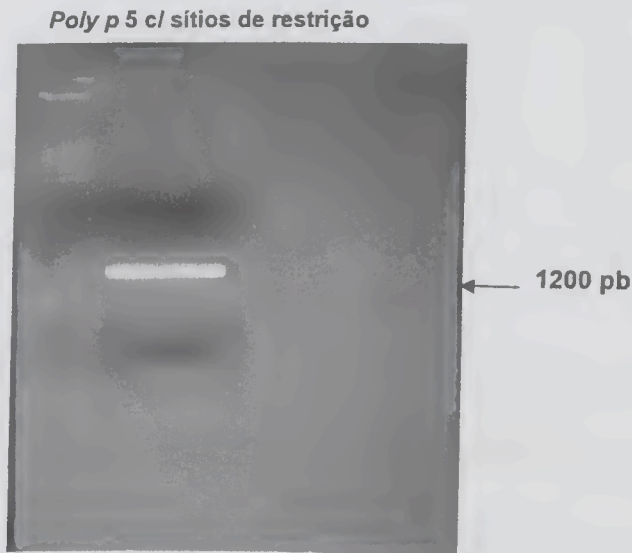
**Figura 14.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% em TAE 0,5X da preparação plasmidial do clone GL2. As PCRs foram realizadas em volume final de 20µL, contendo 2,0µL da preparação plasmidial (206ng/µL) diluída 500X; 0,2mM de dNTP mix ;0,4µM de cada um dos *primers* Ag5F\_exp e Ag5R\_exp; 2,5U da enzima Taq High Fidelity (Thermo Scientific) (**linhas 1, 2 e 3**) ou Taq polimerase proveniente do Master Mix Qiagen (**linhas 6 e 7**). Obs: a amostra 6 foi perdida durante a PCR. L1: DNA ladder de 1kb (Invitrogen - cod. 15615-016. Condições das PCRs: 95°C 5min, 35X (95°C 1min; 45°C-47,5°C 1min, 72°C 3min) 72°C 15min, 4° ∞.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após otimização das condições de PCR para amplificação da banda de *Poly p 5* com os sítios de restrição descritos (temperatura de 45,1°C, uso da enzima Taq High Fidelity, Thermo Scientific, e uma reação final poliadenilação), foi feita sua clonagem inicial em vetor TOPO GW conforme descrito em Material e Métodos (**Figura 15**).

**Figura 15.** Perfil eletroforético da banda de *Poly p 5* já contendo os sítios de restrição de NdeI e EcoRI em gel de agarose a 1,5% em TAE 0,5X. A PCR foi realizada em maior volume (150µL divididos em 3 tubos de 50uL). Utilizou-se 2,5U da enzima Taq High Fidelity (a 5U/µL Thermo Scientific) e 45,1°C de temperatura. Após a PCR, foi feita uma reação de poliadenilação conforme descrita no texto e o produto da reação submetido eletroforese conforme se observa: L1: DNA ladder 1 kb. Condições das PCRs: 95°C 5min, 35X (95°C1min; 45°C-47,5°C 1min, 72°C 3min) 72°C 15min, 4° ∞.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 6.7. Síntese do gene *Poly p 5* (GenScript), Clonagem em vetor pUC57, subclonagem em vetor pPICZαA para expressão em *Pichia pastoris* X-33

De acordo com a análise de *codon usage* em *Pichia pastoris*, para otimização da expressão de *Poly p 5* neste sistema, a sequência de DNA codificadora da proteína *Poly p 5*, nativa do veneno de *P. paulista*, teve que ser modificada (realizado pela

empresa *GenScript*- USA). A estratégia de clonagem utilizada para o *Poly p 5* está descrita a seguir:

#### - Síntese do gene (*Poly p 5*) e clonagem em pUC57 (*GenScript*)

$\alpha$ Factor signal peptide	His-Tag	EK cleavage site	Antigen 5
--------------------------------	---------	------------------	-----------

```

1      AATAAGTACT GTAATATCAA ATGCTCCAAA GTTGCCACACA CTGTCTGCCA ATACGGTGAA
61     TCCACAAAAC CTTCTTCTAA ATGTAACAAA GTTTCATAA CTAGTGTCGG TGTTACAGAA
121    GAAGAAAAGA AATTGATCGT CGATGAACAT AACAGATTCA GACAAAAGGT TGCACAAGGT
181    TTAGAAACTA GAGGTAACCC AGGTCCTCAA CCAGCTGCAT CTGATATGAA TAACTTGGTT
241    TGGAATGACG AATTAGCATA TATTGCCCAA GTTTGGGCCT CACAATGTCA ATTTTTCGTA
301    CACGATAAGT GCAGAAACAC AGCTCAATAC CAAGTTGGTC AAAACATAGC TTATTCTGCA
361    TCAACCGCCG CTTACCCTGG TATCGTATCT TTGATAGTCT TGTGGGAAAA CGAAGTAAAG
421    GACTTCAACT ACTCTCAAGG TATCACAAAG GAAAACCTTCT CAAAAGTAGG TCATTACACC
481    CAAGTTGTAT GGGCTAAAAC TAAGGAAGTC GGTGTGGTT CCATTAAGTA CATCGAAAAG
541    GGTATGAAGA GTCACTACTT GGTATGCAAC TATGGTCCTG CTGGTAACTA CATGGGTCAA
601    CCTATCTACA CAAAGAAG
  
```

#### - Subclonagem do *Poly p 5* em vetor de expressão pPICZaA de *Pichia pastoris*

Tradução ( $\alpha$ -factor signal peptide + His tag + EK cleavage site + antígeno 5)

Proteína =302aa; MW=33410.4 Da; pI Teórico =6.90

```

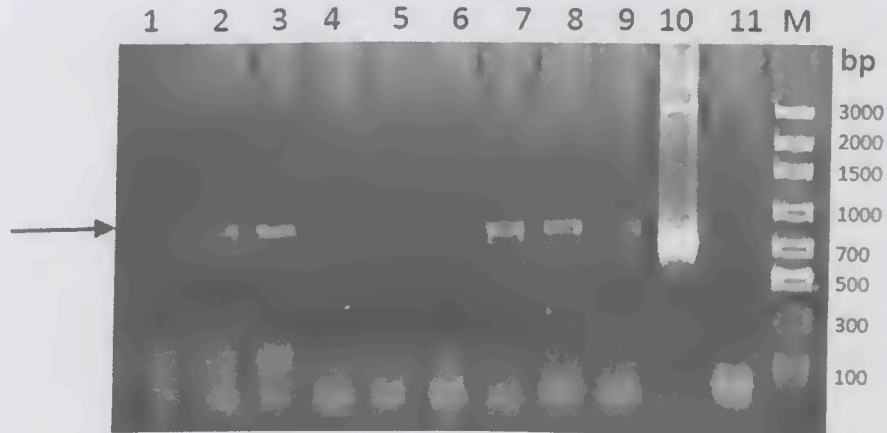
1      MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPAEAVIG YSDLEGDFDV AVLPFSNSTN
61     NGLLFINTTI ASIAAKEEGV SLEKRHHHHH HDDDDK NKYC NIKCSKVAHT VCQYGESTKP
121    SSKCNKVSIT SVGVTEEEKK LIVDEHNRFR QKVAQGLETR GNPQPQPAAS DMNNLVWNDE
181    LAYIAQVWAS QCQFFVHDKC RNTAQYQVGQ NIAYSASTAA YPGIVSLIVL WENEVKDFNY
241    SQGITKENFS KVGHYTQVWV AKTKEVGCGS IKYIEKGMKS HYLVCNYGPA GNYMGQPIYT
301    KK
  
```

### 6.8 Transformação e Identificação dos clones positivos

Da construção linearizada pPICZaA – *Poly p 5*, 10 $\mu$ g foram usadas para a transformação da cepa X-33 de *Pichia pastoris* e os primers 5'AOX1 e 3'AOX1 foram utilizados nas análises de PCR e de sequenciamento. Sendo assim, 9 colônias

transformantes foram selecionadas (**Figura 16**), nas quais pode ser observado a presença do inserto de *Poly p 5* esperado.

**Figura 16.** Detecção dos transformantes positivos utilizando os *primers* de sequenciamento 5' AOX1 e 3' AOX1. Canaletas 1 – 9: Transformantes X-33/ pPICZαA – *Poly p 5*; Canaleta 10: Vetor pPICZαA – *Poly p 5*; Canaleta 11: cepa X-33 como controle negativo e Canaleta M: Marcador de DNA.

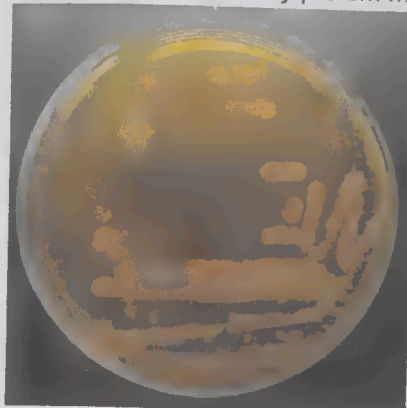


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 6.9. Expressão de *Poly p 5*- pPICZαA

As placas contendo as células X-33/pPICZαA- *Poly p 5* (**Figura 17**) foram crescidas *overnight* em meio YPD-agar (Yeast Extract peptone Dextrose) – (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, dextrose (glicose) a 2%, agar a 2% e Zeocina a 100µg/mL), a 28°C. Uma colônia isolada da placa foi selecionada para prosseguir com a expressão, conforme descrito em Material e Métodos.

**Figura 17.** Placa contendo colônias de X-33/pPICZαA-*Poly p 5* em meio YPD.



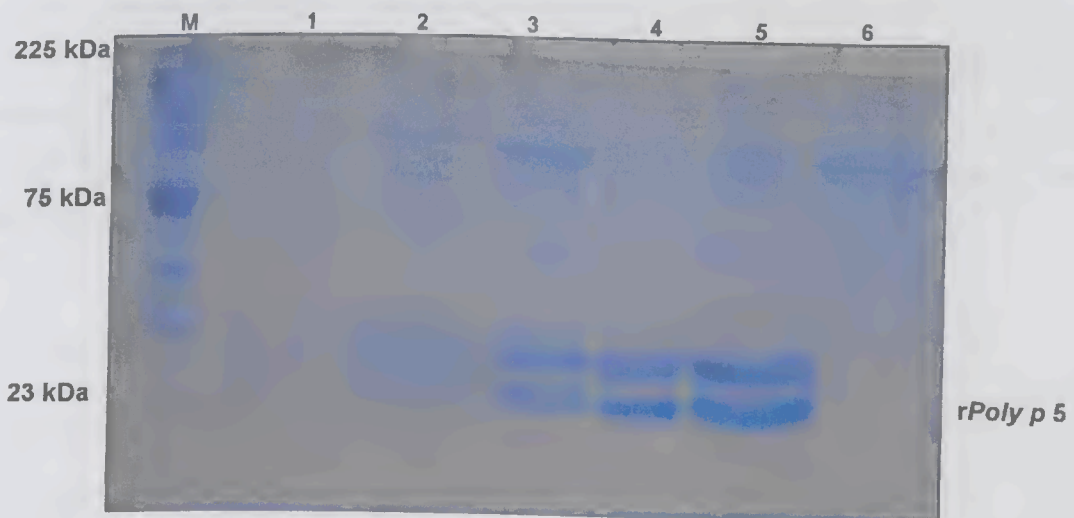
Fonte: Elaborado pelo autor.

A expressão da proteína recombinante *rPoly p 5* em *P. pastoris* foi analisada pela medida de  $DO_{600nm}$ , no período de 0 – 120 horas de indução com metanol a 1% final em meio BMMY adicionado a cada 24 horas (Tabela 6). Após centrifugação em baixa velocidade e descarte do precipitado, o sobrenadante foi coletado e analisado por SDS-PAGE 12% (Figura 18).

**Tabela 6.** Acompanhamento do nível de expressão da proteína alergênica *rPoly p 5* em *P. pastoris*, após a indução de metanol a 1% adicionado a cada 24h.

Tempo de incubação (h) da cultura de <i>rPoly p 5</i> em meio BMMY	$DO_{600 nm}$ (alíquotas retiradas da cultura)
T <sub>0</sub>	0,874
T <sub>24</sub>	6,3
T <sub>48</sub>	8,3
T <sub>72</sub>	10,1
T <sub>96</sub>	11,6
T <sub>120</sub>	11,7

**Figura 18.** Análise de SDS-PAGE a 12% da expressão *rPoly p 5* em *P. pastoris* induzida à 28°C com metanol (1%). (M) Broad Range Protein Molecular Weight Markers – PROMEGA – 608-274-4330. (1) 24 horas após a indução. (2) 48 horas. (3) 72 horas. (4) 96 horas. (5). 120 horas. (6) Controle negativo *P. pastoris* transformado com vetor vazio.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo a **Figura 18**, podemos avaliar que o melhor nível de expressão do alérgeno *rPoly p 5* na cepa x-33 ocorreu com 120h de indução em acordo com trabalhos anteriores, possuindo este uma massa molecular em torno de 23 kDa (HOFFMAN, 1993).

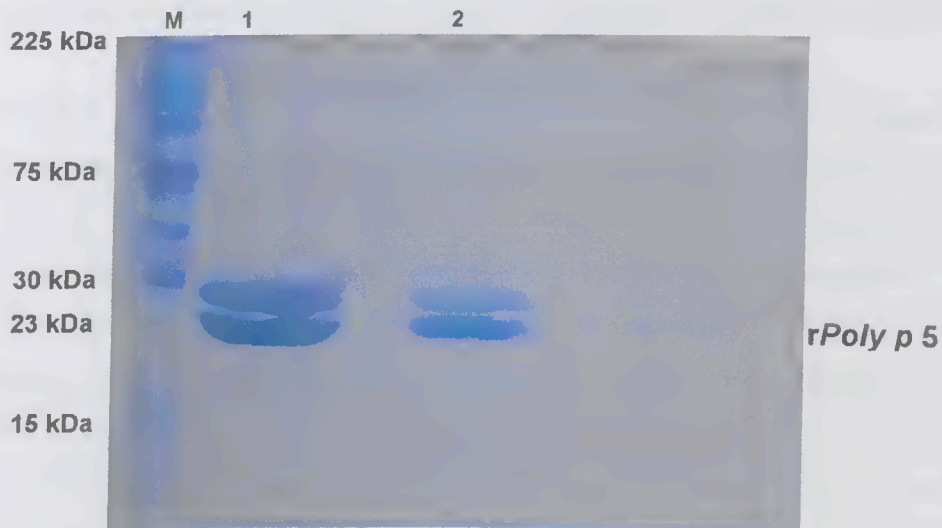
#### **6.10 Purificação e análise da amostra de *rPoly p 5* – *Pichia pastoris* (120 horas) em coluna de His-Trap Ni<sup>2+</sup>**

Métodos cromatográficos são comumente utilizados para identificar e separar proteínas de diferentes tamanhos moleculares, carga-iônica, ponto isoelétrico, propriedades de ligação, através de fracionamentos sucessivos.

As técnicas cromatográficas mais comuns empregam colunas verticais nas quais, as amostras são aplicadas e as moléculas proteicas que as constituem se distribuem em uma fase estacionária e outra móvel. A fase móvel corresponde ao solvente cujo fluxo arrasta a maioria das moléculas presentes nas amostras. No entanto, a fase estacionária é constituída de um material imóvel acondicionado (como resinas carregadas, camadas porosas, papel filtro, entre outros) de modo a interagir com mistura de proteínas e outras moléculas (ZAHA et al., 1996; STRYER et al., 1988). Neste trabalho, para isolar o alérgeno *rPoly p5* foram utilizadas as técnicas de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA-Agarose, seguida pela cromatografia de exclusão molecular (ultrafiltração) em coluna Sephadex G-100.

Para isso, a amostra de T<sub>120</sub> horas foi previamente filtrada em membranas de conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 4.12). Após filtração, concentração e ressuspensão da amostra no tampão selecionado para a coluna de afinidade His-Trap Ni<sup>2+</sup>, a amostra foi eluída com 75 mM de Imidazol, como pode ser visualizado pela análise realizada por SDS-PAGE a 12% (**Figura 19**).

**Figura 19.** Purificação do alérgeno recombinante *rPoly p 5* por cromatografia de afinidade. Análise das frações eluídas da coluna Ni-NTA realizada em SDS-PAGE 12%. (**M**): Broad Range Protein Molecular Weight Markers – PROMEGA – 608-274-4330. (**1 e 2**): Amostras *rPoly p 5* com 75 mM de Imidazol, eluídas da coluna Ni-NTA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir das Figuras 18 e 19 acima, podemos observar que a purificação da *rPoly p 5* ocorreu de forma muito eficiente. No entanto, em todos os experimentos, independentemente das condições testadas verificou-se sempre a presença de duas bandas, sendo uma de 30 kDa e outra logo abaixo de 23 kDa. A presença da dupla banda de *rPoly p 5* em SDS-PAGE já havia sido descrito por King et al (2001) e por Vinzón et al (2010), os quais, visualizaram o mesmo fenômeno para este alérgeno, após todo os processos de purificação, em *Vespula vulgaris* e também em *Polybia scutellaris*, respectivamente. Em ambos os relatos, os autores explicaram os dados observados como sendo resultantes de diferentes extensões do processamento pós-traducional, nas extremidades N-terminais das proteínas, como por exemplo, a glicosilação.

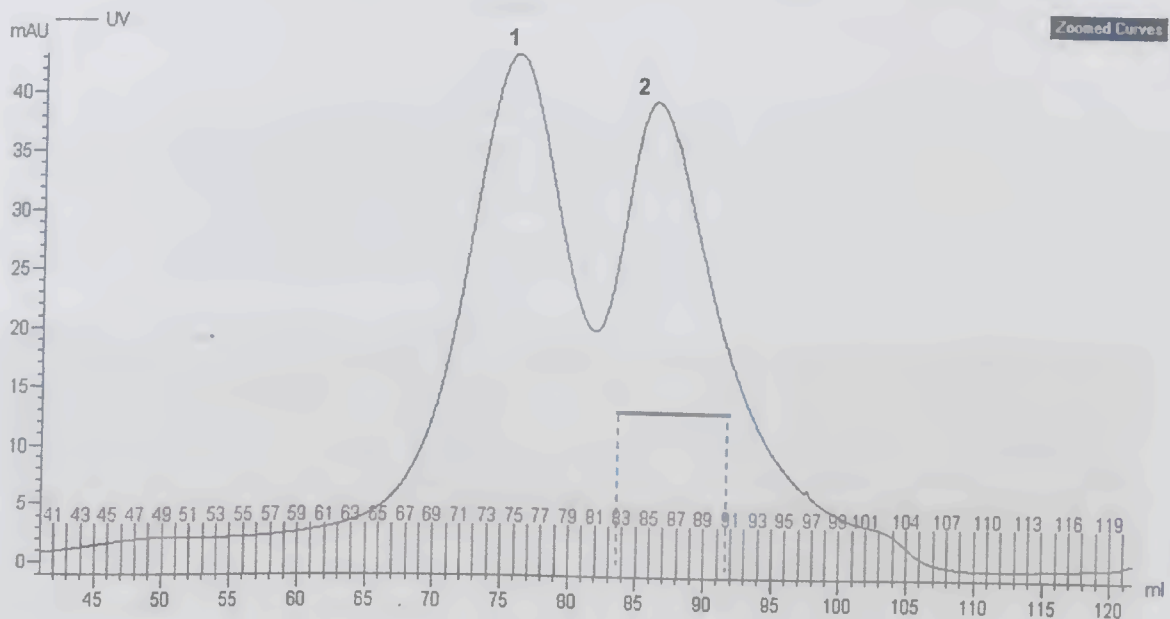
Em comparação com outras leveduras, *Pichia pastoris* possui um baixo nível de N-glicosilação. O comprimento das cadeias de oligossacarídeos adicionadas pós-traducionalmente às proteínas em *P. pastoris* (em média de 8 a 14 resíduos de carboidratos por cadeia lateral) é muito mais curto do que ocorre durante a expressão nas demais leveduras, como por exemplo em *Saccharomyces cerevisiae*. Pouca O-glicosilação foi observada em *P. pastoris*. Se a glicosilação for indesejável, os

oligossacarídeos podem ser removidos com a enzima N-Glicosidase ou por coluna de exclusão molecular.

### 6.11. Purificação de *rPoly p 5* por exclusão molecular em coluna Sephadex G-100

A amostra correspondente à banda de interesse, visualizada na **Figura 19**, foi concentrada em tampão acetado de amônio, conforme descrito em Material e Métodos (Item 4.12) e submetida à ultrafiltração em coluna Sephadex G-100 acoplada ao sistema ÄKTA-FPLC. As **Figuras 20, 21 e 22** mostram respectivamente, o perfil cromatográfico da separação das duas formas de *rPoly p 5* (de ~30 kDa e ~23 kDa) por exclusão molecular, e análises em SDS-PAGE das frações do perfil cromatográfico, bem como do *pool* das frações de maior absorvância, eluídas do pico 2. Por meio da estratégia de ultra filtração verifica-se que foi possível a separação completa de ambas as formas de *rPoly p 5*.

**Figura 20.** Perfil cromatográfico de *rPoly p 5* por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-100 acoplada ao sistema ÄKTA-FPLC. A coluna foi equilibrada com o tampão acetato de amônio 5 mM, pH 6,8, sendo as frações coletadas a um fluxo de 1 mL/min em volume de 1 mL. A absorvância a 280 nm e a condutância foram monitoradas durante o processo. (1) – forma de *rPoly p 5* com 30 kDa. (2) – forma de *rPoly p 5* com 23 kDa. A linha cinza, horizontal no pico 2, é referente à região de onde foram coletadas as frações de maior concentração da forma de 23KDa.



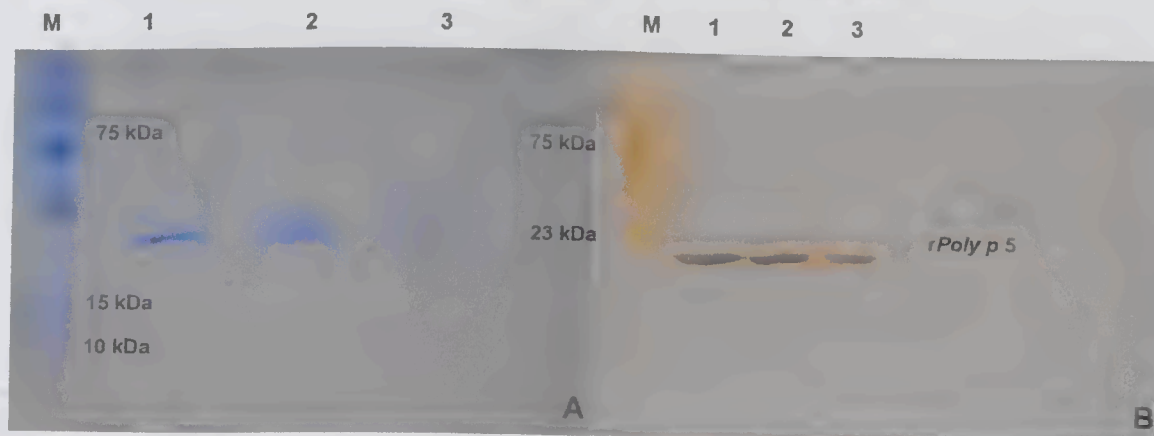
Fonte: Elaborado pelo autor.

O pico 1 da **Figura 20** refere-se à forma de *rPoly p 5* de maior tamanho (30 kDa), analisada em SDS-PAGE (**Figura 21 A, B**) e muito provavelmente é resultante da adição de maior número de resíduos de manose na proteína durante o processo de expressão em *P. pastoris*. Por outro lado, o pico 2 deve provavelmente corresponder à forma de *rPoly p 5*, com tamanho de 23 kDa visualizada em SDS-PAGE 12% (**Figura 21 C e 22 A, B**) contendo o número de resíduos de manose equivalente à molécula nativa ou apenas inferior à forma de 30kDa. A confirmação destes dados só poderá ser obtida após análise comparativa com a molécula nativa de *Poly p 5* purificada.

**Figura 21.** Análise das frações do perfil cromatográfico de *rPoly p 5* (pico 1 e pico 2). (M) Broad Range Protein Molecular Weight Markers – PROMEGA – 608-274-4330 (A) Frações 66 à 74 (B) 75 à 83 (C) 84 à 92.



**Figura 22.** Perfil proteico obtido em SDS-PAGE 12%, das frações 90, 91 e 92, provenientes do pico 2, obtidas na cromatografia de exclusão molecular e correspondente à forma de *rPoly p 5* de ~23kDa, no qual as proteínas foram coradas com Coomassie Blue binding - (M) Broad Range Protein Molecular Weight Markers – PROMEGA – 608-274-4330. (1 – 3, correspondentes respectivamente às frações 90,91 e 92 de *rPoly p 5* purificadas por exclusão molecular. (B) idem a (A) somente com a diferença de que gel foi corado com prata, para evidenciar o grau de pureza das amostras.



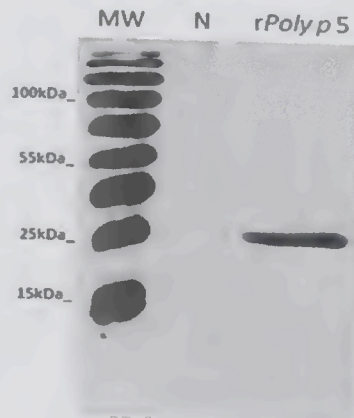
Na **Figura 22** observa-se que houve excelente resultado quanto ao processo de separação das duas formas de *rPoly p 5*, promovendo ainda um alto grau de purificação da amostra de 23 kDa, a mais provável de ter maior similaridade com a forma nativa de *Poly p 5*, devido ao valor de massa molecular, embora outros experimentos comparativos, tais como os de deglicosilação e sequenciamento dos N-terminais de ambas proteínas – nativa e recombinante, ainda sejam necessários para a confirmação desta similaridade.

### 6.12 Confirmação da obtenção e purificação de *rPoly p 5* (23KDa) por anticorpo anti-His

Anticorpos monoclonais anti-His são utilizados para detectar proteínas recombinantes que contém caudas de histidinas. As detecções podem ser realizadas tanto na extremidade C-terminal quanto na extremidade N-terminal, dependendo de onde os resíduos foram adicionados, e possui reconhecimento altamente sensível e específico aos epítomos contendo estes resíduos do aminoácido histidina (HHHHH).

Afim de averiguar se o *rPoly p 5* de 23KDa, purificado tratava realmente da proteína expressa, apresentando a cauda de polihistidina, realizou-se um *Western Blot* com anticorpo Penta His (**Figura 23**), na qual pode ser observado que a proteína expressa e purificada - *rPoly p 5* de 23 KDa - apresenta a cauda de polihistidina na porção N-terminal, conforme foi delineado, durante o processo de clonagem do cDNA de interesse.

**Figura 23.** *Western blot* com anticorpo Penta His (1: 2000) para detecção da *rPoly p 5*. (MW) Pageruler Prestained Protein Ladder SM0671 – Fermentas. N: controle negativo, cultura de *P. pastoris* não induzido. *rPoly p 5* (23KDa) purificado.

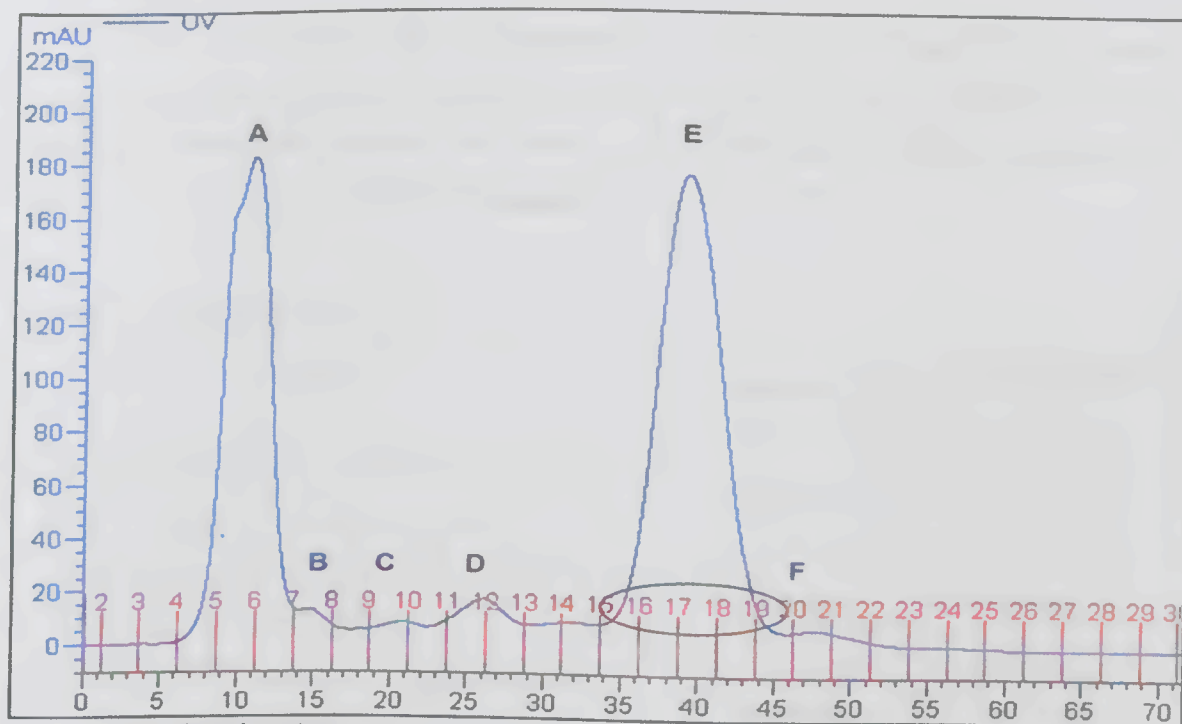


Da análise de *Western Blot* da mesma Figura acima, verifica-se que na canaleta N referente ao controle negativo (cultura de *P. pastoris* não induzido com a proteína *Poly p 5*) não apresentou presença quanto a cauda de histidina, reafirmando o resultado deste experimento.

### 6.13. Purificação e dosagem de *nPoly p 5*

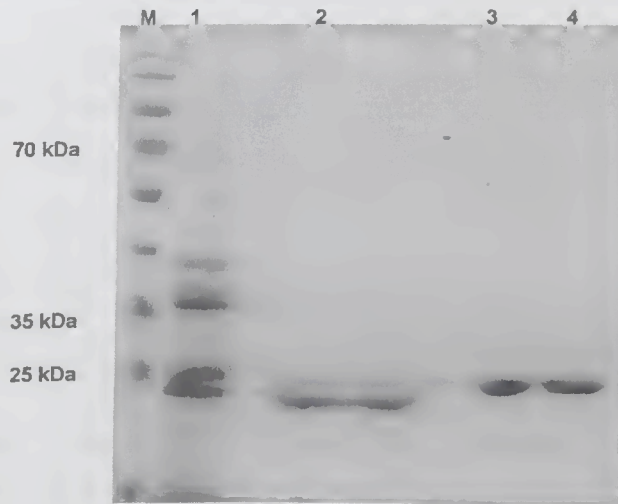
A cromatografia do extrato de veneno bruto (23 mg) obtido da vespa *P. paulista* produziu seis picos, denominados de A – F (Figura 24). Após análise das frações coletadas, deste cromatograma, por SDS-PAGE 12% (Figura 25) verificou-se que muito provavelmente, o *nPoly p 5* estivesse associado ao pico F (frações 16-19), no qual foi detectada uma banda protéica de massa molecular de ~23 kDa, tamanho esperado para esse alérgeno.

**Figura 24.** Perfil cromatográfico de troca catiônica para o extrato de veneno bruto de *P. paulista* (23 mg) obtido numa coluna Hiprep FF CM (16 x 10 mm, 20 mL; GE Healthcare) acoplada em sistema AKTA-FPLC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 25.** Análise em SDS-PAGE 12% das proteínas purificadas (*rPoly p 5* e *nPoly p 5*) comparativamente ao veneno bruto de *P. paulista* (**M**) Pageruler Prestained Protein Ladder SM0671 – Fermentas. **(1)** Veneno bruto de *Polybia paulista*. **(2)** *nPoly p 5* purificado (pico F, frações 16-19, **Figura 24**). **(3 e 4)** *rPoly p 5* purificado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a purificação por cromatografia de exclusão molecular, foi necessário dosar a proteína recombinante expressa, para obtermos o rendimento final, conforme descrito em Material e Métodos. A quantificação mostrou que o *rPoly p 5* purificado foi obtido em uma concentração de 158 µg/mL.

**Tabela 7.** Quantificação da proteína *rPoly p 5*.

ETAPA	CONCENTRAÇÃO	RENDIMENTO (%)
1- Expressão (sobrenadante do meio de cultura, 120h de indução)	3,580 µg/mL	100
2- Purificação em coluna de afinidade His-Trap Ni <sup>+2</sup>	1,380 µg/mL	38,5
3- Purificação em coluna de Exclusão molecular – Sephadex G-100	158 µg/mL	4,41

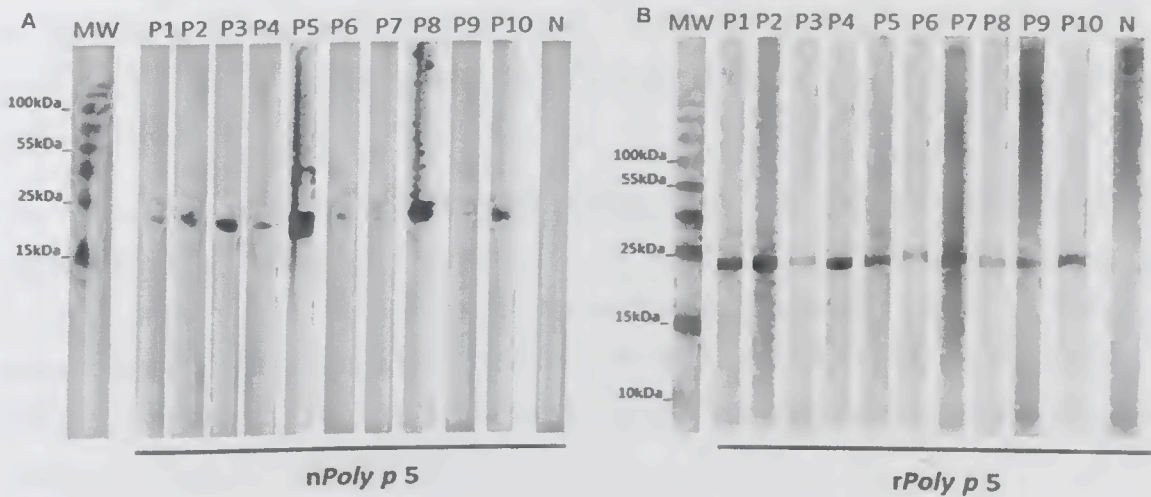
### 6.14 Imunodeteccção mediada por IgE

A imunodeteccção mediada por IgE específica, presente em soros de 10 pacientes sensibilizados com veneno de *P. paulista*, foi analisada contra *rPoly p 5*, *nPoly p 5* e extrato de veneno bruto.

Os ensaios de *Western blot*, utilizando-se o sistema ImmunoCAP, mostraram que a proteína recombinante purificada (por exclusão molecular) foi capaz de se ligar à IgE de todos os soros de pacientes alérgicos testados. Além disso, pode-se dizer, por esta análise que, em termos qualitativos, a sensibilidade das reações foi semelhantes para ambas formas das proteínas – natural - *nPoly p 5* (**Figura 26 A**) e recombinante - *rPoly p 5* (**Figura 26 B**) nos soros de pacientes previamente diagnosticados com alergia ao veneno de *P. paulista*.

Adicionalmente, os resultados destas análises demonstram que foi detectada uma única banda tanto para *nPoly p 5* como para *rPoly p 5* em 100% dos pacientes testados, demonstrando o elevado grau de sensibilidade e especificidade dos anticorpos IgE para o alérgeno antígeno 5, bem como, o grau de pureza dos alérgenos testados. As análises também demonstraram que não ocorreu reação quando o extrato de veneno bruto, bem como as formas nativa e recombinante de *Poly p 5* foram testados com soro de pacientes não sensibilizados (controles negativos) (**Figuras 26 A e B**).

**Figura 26 A e B.** Resultado das análises de *Western blot* para a imunoreatividade, mediada por IgE de soros (diluição 1:50) de pacientes alérgicos ao veneno de *P. paulista*, contra as formas nativa – *nPoly p 5* e recombinante – *rPoly p 5* –, purificadas. MW: Marcador de massa molecular, P1-P10: soros de pacientes alérgicos, N: controle negativo - *pool* de soros (5) de pacientes não alérgicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Acidentes envolvendo insetos sociais da ordem Himenóptera são comuns em todo o mundo e a complexidade dos componentes no veneno destas espécies faz com que eles despertem grande interesse voltado à investigação na área médica (GOLDEN, 1997). Uma pessoa ferroadada por grande quantidade destes insetos pode sofrer reações sistêmicas capazes de leva-lá a morte (KOLECKI, 1999). Dentre os principais compostos dos venenos de himenópteras sociais, atenção maior é dada às proteínas, por serem reconhecidas como importantes alérgenos (PANTERA et al., 2003). As proteínas de maior interesse e que são encontradas em maior abundância no veneno de vespas, incluindo a espécie aqui estudada, *P. paulista*, são as fosfolipases A1, hialuronidase e o Ag 5 (KING, et al., 1983; CARDOSO et al., 2003, HOFFMAN, 2006).

No Brasil existem aproximadamente 320 espécies de vespas sociais, superagressivas e que moram próximas à população urbana. Como ainda não existem extratos alérgênicos padronizados para as vespas endêmicas, muitas vezes o material utilizado para diagnóstico tem de ser importado e geralmente são provenientes de venenos brutos ou alérgenos de espécies do hemisfério norte.

Por outro lado, o problema da utilização de extratos de venenos brutos, provenientes das vespas do hemisfério sul para diagnóstico de alergia, é que geralmente não foram totalmente purificados, contendo assim misturas de compostos alergênicos e reticulados, o que torna difícil identificar com precisão o alérgeno que induz a doença, em pacientes sensibilizados por duas ou mais fontes de alérgenos (SANTOS et al., 2010).

Estudos sobre imunoreatividade cruzada são de extrema importância em pesquisas de alérgenos dos venenos de himenópteros sociais. Muitas vezes um mesmo alérgeno pode ser reconhecido por anticorpos produzidos contra um antígeno de outro veneno. Essa dupla positividade também causa problemas de diagnóstico e dificulta o tratamento imunoterápico de pacientes que não reconheceram o inseto causador da ferroadada (ERZEN et al., 2009).

No caso do veneno de *P. paulista* não existem apenas três proteínas alergênicas. Santos et al. (2010) observaram pelo menos 16 moléculas que causam reatividade, o que indica que, se utilizarmos o veneno bruto para imunoterapia estaremos sensibilizando o paciente com vários outros componentes alergênicos, mesmo que se consiga o diagnóstico específico, para um ou outro dos alérgenos já caracterizados.

O Ag 5 é um dos alérgenos mais utilizados, juntamente com a fosfolipase, para o diagnóstico específico da alergia, quando se trata de alérgenos recombinantes. Quando são analisadas todas as proteínas alergênicas, a resposta para o Ag 5 fica evidente por duas razões: (a) pelas próprias características estruturais de seus epítomos e (b) pela sua abundância, pois este alérgeno tem sido relatado em quase todos os sistemas de diagnóstico molecular de alergias (diagnóstico baseado em componentes). Além disso, o Ag 5 possui um nível de glicosilação muito baixo, sendo considerado uma molécula não glicosilada, juntamente com a fosfolipase e isso impede que o diagnóstico tenha reatividade cruzada para regiões determinantes de carboidratos (CCDs).

A obtenção e purificação de um determinado alérgeno natural, a partir dos venenos de vespas é um processo complicado, de baixo rendimento e muitas vezes dispendioso. Na maior parte das vezes a purificação ocorre de forma parcial com traços de algumas outras moléculas (MULLER, 2001). Como alternativa, a produção

de alérgenos recombinantes é uma estratégia eficiente para a obtenção de grandes quantidades de material puro e de forma relativamente rápida, permitindo a realização de estudos sobre o potencial biológico da proteína alergênica.

Nossos resultados mostraram que a forma recombinante de *Poly p 5*, obtida solúvel, através da expressão em *P. pastoris* é alergênica quando testada em soros de pacientes. O *rPoly p 5* induz uma resposta imunológica e essa resposta é do mesmo nível que sua variante natural (*nPoly p 5*), o que demonstra que essa molécula pode ser considerada como uma forte candidata para o uso do diagnóstico molecular. Não apenas o *Poly p 5*, mas outras variantes recombinantes obtidas em nosso laboratório, tais como Fosfolipase A1 (*Poly p 1*) (PEREZ-RIVEROL et al., 2016) e a Hialuronidase (*Pp-Hyal*) (JUSTO JACOMINI et al., 2013), tem também demonstrado este potencial.

Desta forma, o uso combinado desses três alérgenos aumentaria a especificidade e a sensibilidade do diagnóstico, ajudando a melhorar a qualidade de vida de pacientes com alergia ao veneno de *P. paulista*, devido ao fato de serem alérgenos recombinantes e por não possuírem qualquer contaminação com o restante dos componentes do veneno, que podem gerar reatividade cruzada.

O elevado número de reações alérgicas causadas por ferroadas de *P. paulista* no Brasil evidencia a necessidade de maiores pesquisas para aprofundamento dos conhecimentos bioquímicos sobre os alérgenos das vespas sociais (LIMA, BROCHETTO-BRAGA, 1994), bem como, para a utilização dos alérgenos recombinantes para a imunoterapia e diagnóstico, o que representa uma das principais perspectivas deste trabalho.

## 7 CONCLUSÕES

- Através do desenho de *primers* específicos para o Ag 5 de *Polybia paulista* a sequência completa do cDNA *Poly p 5* (621 bp) foi obtida e depositada no GenBank sob o código GenBank: KU558986.1
- Após otimização de códons e clonagem em vetor de expressão pPICZ $\alpha$ , a expressão heteróloga da proteína *rPoly p 5* em levedura *P.pastoris* foi muito bem sucedida e em níveis de 158  $\mu\text{g/mL}$ , sendo expressa em duas formas (30 kDa e 23 kDa), muito provavelmente devido a diferentes graus de glicosilação entre ambas.
- Devido a diferença de 10 kDa entre ambas formas de *rPoly p 5*, expressas em levedura *P.pastoris*, as mesmas puderam ser muito eficientemente separadas por exclusão molecular, permitindo a obtenção da forma de 23 kDa com alto grau de pureza, a qual, exibe massa molecular esperada e de grande similaridade com outros Ag 5 de veneno de Hymenoptera sociais.
- O soro imune de pacientes alérgicos ao veneno de *P. paulista*, reconheceu especificamente a banda correspondente à proteína *rPoly p 5* (~25 kDa) em uma intensidade semelhante do alérgeno nativo *nPoly p 5*.
- O padrão de reconhecimento dos soros imunes ao alérgeno *rPoly p 5* sugere fortemente que este antígeno recombinante poderá ser utilizado para desenvolver um kit diagnóstico de alergia, bem como para imunoterapia específica (IT).

## REFERÊNCIA

- AALBERSE, R.C. Structural Biology of Allergens. **J. Allergy Clin Immunol**, Saint Louis, v.106, n.2, p.228-238, 2000.
- ABBAS, K. A., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunologia celular e Molecular**. 6ª ed. Saunders, Rio de Janeiro, 215-242; 441-462, 2008.
- AL-GHOULEH, A., JOHAL, R., SHARQUIE, I.K., EMARA, M., HARRINGTON, H., SHAKIB, F., GHAEMMAGHAMI, A.M. The glycosylation pattern of common allergens: the recognition and uptake of Der p 1 by epithelial and dendritic cells is carbohydrate dependent. **PLoS One** v.7 (3): e33929, 2012.
- ASOJO, O. A.; GOUD, G.; DHAR, K.; LOUKAS, A.; ZHAN, B.; DEUMIC, V.; LIU, S.; BORGSTHAL, G. E. O.; HOTEZ, P. X-ray structure of Na-ASP-2, a Pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. **J. Mol. Biol.**, 346, 801-814, 2005.
- BALZER, L.; PENNINO, D.; BLANK, S.; SEISMANN, H.; DARSOW, U.; SCHNEDLER, M.; MCINTYRE, M.; OLLERT, M.W.; DURHAM, S.R.; SPILLNER, E. Basophil activation test using recombinant allergens: Highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. **PLoS ONE**. v. 9, e108619, 2014.
- BARLOW, D.J.; EDWARDS, J.M.; THORTON, J.M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature**, New York, v.322, p.747-748, 1986.
- BILÒ, B.M. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: From epidemiology to treatment. **Allergy**. v.66, p.35-37, 2011.
- BILÒ, B.M.; BONIFAZI, F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: Clinical implications. **Clin. Exp. Allergy**. v.39, p.1467-1476, 2009.
- BILÓ, B.M.; RUEFF, F.; MOSBECH, H.; BONIFAZI, F.; OUDE-ELBERINK, J.N.G, et al. **Diagnosis of Hymenoptera venom allergy**, p.1339-1349, 2005.
- BLANK, S.; SEISMANN, H.; BOCKISCH, B.; BRAREN, I.; CIFUENTES, L.; MCINTYRE, M.; RÜHL, D.; RING, J.; BREDEHORST, R.; OLLERT, M.W. Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high molecular weight hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3. **J. Immunol.** v.184, p. 5403-5413, 2010.
- BLUM, H; BEIER, H; GROSS, HJ. Improved silver staining of plant protein, RNA, DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** v. 81, p. 93-99, 1987
- BRIERLEY, R. A.; BUSSINEAU, C.; KOSSON, R.; MELTON, A.; SIEGEL, R. S. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expression the heterologous gene: bovine lysozyme. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 350-362, 1992.
- CALVO, E.; DAO, A.; PHAM, V. M.; RIBEIRO, J. M. Na insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals na emerging pattern in anopheline salivary protein families. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 37, 164-175. 2007.
- CARDOSO, J. L. C. et al. Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2 ed. São Paulo: **Sarvier**, 2003. 468 p.
- CARUSO, B.; BONADONNA, P.; BOVO, C.; MELLONI, N.; LOMBARDO, C.; SENNA, G.; LIPPI, G.; Wasp venom allergy screening with recombinant allergen testing. Diagnostic performance of rPol d 5 and rVes v 5 for differentiating sensitization to *Vespula* and *Polistes* subspecies. **Clinica Chimica Acta**. v.453, p.170-173, 2016.

- CASCONE, O.; AMARAL, V.; FERRARA, P.; VITA, N.; GUILLEMOT, J. C.; DÍAZ, L.E. Purification and characterization of two forms of antigen-5 from the *Polybia scutellaris* venom. **Toxicon**, Elmsford, v.38, p. 1367-1379, 1995
- CASTRO F.F.M ; PALMA, M.S. **Alergia a Venenos de Insetos**. 1. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, v. 1. 236 p, 2008.
- CASTRO, F.F.M.; PALMA, M.S. **Alergia a venenos de insetos**. Phadia, Brasil, p. 231, 2009.
- CASTRO, F.F.M.; PALMA, M.S.; BROCHETTO-BRAGA, M.R.; MALASPINA, O.; LAZARETI, J.; BALDO, M.A.B.; ANTILA, M.A.; ZUPI, L.; CONSERMELLI, W. Biochemical properties and study of cross-antigenicity between Africanized honey bee and wasp venom. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, New York, v.4, p.37- 41, 1994.
- CEREGHINO, J. L., CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Review**, 24(1):45-66, 2000.
- CEREGHINO, J.L., GEOFF P, ILGEN C, CREGG JM. Production of recombinant proteins in ferment or cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotechnol**, 13:329–332, 2002.
- CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J.M. Toward na understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc Natl Acad Sci.**, USA, 96, p. 15155-15160, 1999.
- CHAUD-NETO, J; GOBBI. ; MALASPINA, O. **Biologia e técnica de manejo de abelhas e vespas**. In: BARRAVIERA B. (Ed.). Venenos animais: Uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC. Cap.12, p. 173-193, 1994.
- COS, O.; RESINA, D.; FERRER, P.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F. Heterologous production of *Rhizopus orizae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. **Biochemical Engineering Journal**, 26: 86-94, 2005.
- COSTA, H.; PALMA, M.S. Agelotoxin: a phospholipase A2 from the venom of the neotropical social wasp cassununga (*Agelaia pallipes pallipes*) (Hymenoptera- Vespidae). **Toxicon**, Elmsford, v.38, p.1367-1379, 2000.
- COUDERC R, BARATTI J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agric Biol Chem**, 44: 2279-2289, 1980.
- CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, p. 1316-1323, 1989.
- CREGG, J. M.; MADDEN, K.R. Development of methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production foreign proteins. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 29, p. 33-41, 1988.
- CREGG, J. M.; TSCHOPP, J. F.; STILLMAN, C.; SIEGEL, R.; AKONG, M.; CRAIG, W. S.; BUCKHOLZ, R.G.; MADDEN, L. R.; KELLARIS, P. A.; DAVIS, G. R.; SMILEY, B. L.; CRUZE, J.; TORREGROSSA, R.; VELICELEBI, G.; THILL, G. P. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 5, p. 479-485, 1987.
- CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* (Review). **BioTechnology**, 11:905-910, 1993.
- DAMASCENO LM, HUANG CJ, BATT CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, 93(1):31-9, 2012.

- DE SCHUTTER K, LIN YC, TIELS P, VAN HECKE A, GLINKA S, WEBER-LEHMANN J, ROUZE P, VAN DE PEER Y, CALLEWAERT N: Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nat Biotechnol**, 27:561-566, 2009.
- DEMAIN AL, VAISHNAV P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv.**, 27(3):297-306, 2009.
- EBERLEIN, B., KRISCHAN, L., DARSOW, U., OLLERT, M., RING, J. Double positivity to bee and wasp venom: Improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. **J.Allergy Clin. Immunol.** v.130, p.155-161, 2012.
- ERZEN, R.; KOROSEC, P.; SILAR, M.; MUSIC, E.; KOSNIK, M. Carbohydrate epitopes as a cause of cross-reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom. **The Middle European Journal of Medicine**, v. 121, p. 349-352, 2009.
- ESHER, S.H.G.; CASTRO, A.P.B.M.; CROCE, J.; PALMA, M.S.; MALASPINA, O.; PALMA, M.F.M.; KALLI, J.E.; CASTRO, F.F.M. Study of laboratorial methods for Hymenoptera allergy diagnosis: A critical analysis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.107, n.2, p.375, 2001.
- FABER, K. N., HARDER, W., AB, G., VEENHUIS, M. Review: Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. **Yeast**, 11:1331-1344, 1995.
- FARRELL, A. M.; TAYLOR, D.; HOLLAND, K. T. "Cloning, Nucleotide Sequence Determination and Expression of the *Staphylococcus aureus* Hyaluronate Lyase Gene". **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 81-85, 1995.
- FERRY, X.; EICHWALD, V.; DAEFFLER, L.; LANDRY, Y. Activation of  $\beta\gamma$  subunits of  $G_{i2}$  and  $G_{i3}$  proteins by basic secretagogues induces exocytosis through phospholipases  $C\beta$  and arachidonate release through phospholipases  $C\gamma$  in mast cells. **J. Immunol.**, v.167, p.4805-4813, 2001.
- FITZGERALD, K.T.; FLOOD, A.A. **Hymenoptera stings**. Clin. Tech. Small Anim. Pract, p.194-204, 2006.
- GIBBS, G. M.; ROELANTS, K.; O'BRYAN, M. K. The CAP Superfamily: Cysteine- Rich Secretory Proteins, Antigen-5 and Pathogenesis-Related 1 Proteins – Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense. **Endocrine Reviews**, 29(7), p. 865-897, 2008.
- GIRATTO, D.T., SUEMASU, C.N., JACOMINI, D.L.J.; BROCHETTO-BRAGA, M.R. *Polybia paulista* clone 2.4 venom allergen 5 mRNA, partial cds. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU573767.1>, 2010.
- GOLDEN, D. B.; MARSH, D. G.; FREIDHOFF, L. R.; Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. **J Allergy Clin Immunol**, v. 100, p. 760-766, 1997.
- HABERMANN, E.; NEUMAN, W.P. Reinigung der phospholipase A des bienengftes. **Biochem.**, Moscow, v.28, p.465-473, 1957.
- HAN, J.; YOU, D.; XU, X.; HAN, W.; LU, Y.; LAI, R.; MENG, Q. An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. **Toxicon**. 914-22, 2008.
- HANSON, P.E. & GAULD, I.D. (Eds.). The Hymenoptera of Costa Rica. **Oxford: Oxford University Press**, 893 pp, 1995.

- HENRIKSEN, A.; KING, T. P.; MIRZA, O. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: Structural characterization of a Pathogenesis-related protein superfamily. **Proteins: Structure and Genetics**, 45, 438-448, 2001.
- HINNEN A, BUXTON F, CHAUDHURI B, HEIM J, HOTTIGER T, MEYHACK B, POHLIG G.. In: Smith, A. *Gene Expression in Recombinant Microorganisms*. **Marcel Dekker**, New York, pp. 121-193, 1994.
- HOFFMAN, D.R. Allergens in Hymenoptera Venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic crossreactivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.91, p.71-78, 1993.
- HOFFMAN, D.R. Hymenoptera Venom Allergens. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v.30, p. 109-128, 2006.
- HOLLOWKA, D.; BAIRD, B. Antigen-mediated IgE receptor aggregation and signaling: A window on cell surface structure and dynamics. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25, p. 79-112, 1996.
- JIN, C., HANTUSCH, B., HEMMER, W., STADLMANN, J., ALTMANN F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins.. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.121, p.185-190, 2008
- JUNG E, WILLIAMS KL. The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 25, 3-8, 1997.
- JUSTO JACOMINI, D.L., CAMPOS PEREIRA, F. D., PINTO, J. R. A.S., DELAZARI, L. S., SILVA NETO, A. J., GIRATTO, D. T., PALMA, M. S., ZOLLNER, R. L., BROCHETTO BRAGA, M. R. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v. 64, p.70-80, 2013.
- JUSTO JACOMINI, D.L., MOREIRA, S. M. G., CAMPOS PEREIRA, F. D., ZOLLNER, R. L., BROCHETTO BRAGA, M. R. Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom. **Toxicon**, v 82 , p. 104-111, 2014.
- JUTEL, M.; AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen specific immunotherapy T-cell tolerance and more. **Allergy**. v. 61, p. 796-807, 2006.
- KARABUS, S. Hipersensitivity to stinging insects. **Current Allergy & Clinical Immunology**, v.25, n.3, p.132-138, 2012.
- KINET, J.P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. **Annu. Rev. Immunol.**, v.17, p.931-972, 1999.
- KING, T. P. Cloning and sequencing vespid venom allergens: Sequence similarity and antigenic cross reactivity of hornet antigen 5 and tobacco leaf protein. In **Allergy and Molecular Biology**. Ed. Pergamon Press, New York, v.74, p.129-136, 1989.
- KING, T. P. Immunochemical studies of stinging insect venom allergens. **Toxicon**, 34(11/12):1455-1458, 1996.
- KING, T. P.; ALAGON, A.C.; KUAN, J.; SOBOTKA, A.K.; LICHTENSTEIN, L. M. Immunochemical studies of yellow jacket venom proteins. **Mol Immunol**, v. 20, p. 297-308, 1983.
- KING, T.P.; MORAN, D.; WANG, D.F.; KOCHOUMIAN, L. CHAIT, B.T. Structural studies of a hornet venom allergen antigen 5, *Dol m V* and its sequence similarity with other proteins. **Protein Seq. Data. Anal.**, New York, v.3, n.3, p.263-266, 1990.

KISCHNICK, S.; WEBER, B.; VERDINO, P.; KELLER, W.; SANDERS, E. A.; ANSPACH, F. B.; FIEBIG, H.; CROMWELL, O.; SUCK, R. Bacterial fermentation of recombinant major wasp allergen Antigen 5 using oxygen limiting growth conditions improves yield and quality of inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, v.47, p. 621–628, 2006.

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

KOLECKI, P. Delayed toxic reaction following massive bee envenomation. **Ann Emerg Med**, v. 33, p. 114-116. 1999.

KOROŠEC, P.; VALENTA, R.; MITTERMAN, I.; ČELESNIK, N.; ŠILAR, M.; ZIDARN, M.; KOŠNIK, M. High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 129 (5), p. 1406-1408, 2012.

KOSHIKAWA N, NAKAMURA T, TSUCHIYA N, ISAJI M, YASUMITSU H, UMEDA M, MIYAZAKI K. Purification and identification of a novel and four known serine proteinase inhibitors secreted by human glioblastoma cells. **J Biochem (Tokyo)** 119:334–339, 1996.

KOUTZ, P. J., DAVIS, G. R., STILLMAN, C., BARRINGER, K., CREGG, J. M., THILL, G. Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. **Yeast**, v 5, p. 167-177, 1989.

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

KURTZMAN CP. Biotechnological strains of Komagataella (*Pichia*) *pastoris* are Komagataella *haffi* as determined from multigene sequence analysis. **J.Ind.Microbiol.Biotechnol**, 36: 1435-1438, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227, 680-685, 1970.

LIMA, P. R. M. DE; BROCHETTO-BRAGA, M. R. **Caracterização de serinaproteases em venenos de diferentes subespécies de *Apis mellifera* (Hymenoptera-Apidae)**. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, n. 6, 1994, Guaratinguetá, Resumos. São Paulo: UNESP, 1994, p 135.

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

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

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

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

MILNE, T. J., ABBENANTE, G., TYNDALL, J. D. A., HALLIDAY, J. AND LEWIS, R. J. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31105-31110, 2003.

MINGOMATAJ, E.C.; BAKIRI, A.H.; IBRANJI, A.; STURM, G.J. Unusual reactions to hymenoptera stings: What should we keep in mind? **Clin. Rev. Allergy Immunol.** v.47, p. 91–99, 2014.

MULLER, U. R. New developments in the diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 124, p. 447-53, 2001.

MÜLLER, U. R. Recombinant Hymenoptera venom allergens. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n.7, p. 570-576, 2002.

MÜLLER, U.R. Insect Venoms In; Anaphylaxis. Allergens and Elicitors. Ring J (ed):. Chem Immunol Allergy. Basel, Karger. **Insect Venoms**, vol 95, p.143–158, 2010.

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

NAKAJIMA, T.; YASUHARA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, T.; FUKUDA, K.; TSUKAMOTO, Y. Wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physicochemical properties. **Peptides**, v. 6, p. 425-430, 1985.

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

OLLERT, M.; BLANK, S. 2015. Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics. **Curr Allergy Asthma Rep**, p. 15-26, 2015.

PADAVATTAN, S., SCHIRMER, T., SCHMIDT, M., AKDIS, C., VALENTA, R., MITTERMANN, I., SOLDATOVA, L. et al Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 368, n. 3, p. 742–752, 2007.

PADAVATTAN, S.; SCHMIDT, M.; HOFFMAN, DR.; MARKOVI-HOUSLEY, D. Crystal Structure of the Major Allergen from Fire Ant Venom, Sol i 3. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 383, p.178-185, 2008.

PALMA, M.S. Insect venom peptides. In: KASTIN, A.J. **Handbook of biologically active peptides**. 1 edição, Academic Press, Oxford, p. 389-396, 2006.

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

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

PEREZ-RIVEROL, A.; PEREIRA, F.D.C.; LASA, A.M.; FERNANDES, L.G.R.; SANTOS-PINTO, J.R.A.; JUSTO-JACOMINI, D.L.; DE AZEVEDO, G.O.; BAZON, M.L.; PALMA, M.S.; ZOLLNER, R.L.; BROCHETTO-BRAGA, M.R. Molecular cloning, expression and IgE-immunoreactivity of phospholipase A1, a major allergen from *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) venom. **Toxicon**, v. 124, p. 44-52, 2016.

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

- PRZYBILLA, B.; RUËFF, F. Hymenoptera venom allergy. **Journal of the German**, Munich, German, v. 8, p. 114-129, 2010.
- RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol.**, 48, p. 73-88, 2003.
- RICHES, H. R. C. Hypersensitivity to bee venom. **Bee World**, Bucks, v.63, p.7-22, 1982.
- ROGGENKAMP, R.; JANWIEZ, Z.; STANIKOWSKI, B; HOLLENBERG, C. P. Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Molecular & general genetics**, v. 194, p. 489-493, 1984. Quoted in LIN CEREGHINO, L; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.
- ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene in expression. **Current Opinion in Biotechnology**, 6:527-533, 1995.
- SANTOS, L. D. **Caracterização Molecular dos Antígenos Imunodominantes do Veneno da Vespa Social *Polybia paulista***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.181, 2006.
- SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; PINTO, J. R. A. S.; DIAS, N. B.; SOUZA, B. M.; SANTOS, M. F.; PERALES, J.; DOMONT, G. B.; CASTRO, F. M.; KALIL, E. J.; PALMA, M. S. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: A clue to understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research**, v.9, p.3867-3877, 2010.
- SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; SOUZA, B. M.; ARCURI, H. A.; CUNHA-NETO, E.; CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Purification, Sequencing and structural characterization of the phospholipase A<sub>1</sub> from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**, v. 50, p. 923-937, 2007.
- SANTOS-PINTO, J. R. A. Caracterização do antígeno-5, alérgeno do veneno da vespa social *Polybia paulista* com uma abordagem proteômica. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.108, 2011.
- SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; ARCURI, H. A.; CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Using Proteomic Strategies for Sequencing and Post-Translational Modifications Assignment of Antigen-5, a Major Allergen from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. **Journal of Proteome Research**, v.13, n. 2, p. 855–865, 2014a.
- SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; ARCURI, H. A.; MENEGASSO, A.R.S., PÊGO, P. N., SANTOS, K.S., CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; DE-SIMONE, S.G., PALMA, M. S. B-cell linear epitopes mapping of antigen-5 allergen from *Polybia paulista* wasp venom. **J. Allergy and Clinical Immunol.** Disponível online (in press), 2014b.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- SEDMAK, J. J., GROSSBERG, S. E. A rapid sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. **Anal Biochem**, v. 79. p. 544-552, 1977.
- SEISMANN, H., BLANK, S., BRAREN, I., GREUNKE, K., CIFUENTES, L., GRUNWALD, T., BREDEHORST, R., OLLERT, M., SPILLNER, E. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. **Mol Immunol.** v47, p.799–808, 2010.

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

STRYER, L. **Biochemistry.** New York: W.H. Freeman and Company, p. 881, 1998.

TATE CG & GRISSHAMMER R. Heterologous expression of G protein-coupled receptors. **Trends Biotechnol**, 14, 426-430, 1996.

TSCHOPP, J. F.; BRUST, P. F.; CREGG, J. M.; STILLMAN, C. A.; GINGERAS, T. R. Expression of the LacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic acids research**, v. 15, p. 3859-3876. 1987a.

VALENZUELA, J. G.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. K.; FRANCISCHETTI, I. M.; RIBEIRO, J. M. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** p.1101-1122, 2002.

VAN VAERENBERGH, M.; CARDOEN, D.; FORMESYN, E.M.; BRUNAIN, M.; VAN DRIESSCHE, G.; BLANK, S.; SPILLNER, E.; WENSELEERS, T.; VERLEYEN, P.; SCHOOF, 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.

VINZÓN, S.E., MARINO-BUSLJE, C., RIVERA, E., BISCOGLIO, M.J.B. A Naturally Occurring Hypoallergenic variant of vespid antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom as a candidate for allergen-specific immunotherapy **PLoS One**, v. 7, n. 7, e41351, *on line*, 2012.

VINZÓN, S.E.; PIRPIGNANI, M.L.; NOWICKI, C.; BISCOGLIO DE JIME'NEZ, B. M. Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a hypoallergenic antigen 5. **Protein Expr Purif** 73: 23-30, 2010.

VOVOLIS, V.; MIKOS, N.; KOUTSOSTATHIS, N. Successful venom immunotherapy to paper wasp, in IgE-venom negative patient. **Allergologia et Immunopathologia**. Espanha, p. 1016, 2010.

ZAHA, A. et al. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, p. 336, 1996.