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

**EFEITO DO ALÉRGENO Poly p 5 DO VENENO DE *Polybia paulista*
(HYMENOPTERA, VESPIDAE) NA MODULAÇÃO DO FENÓTIPO FUNCIONAL DE
MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS MURINOS.**

MURILO LUIZ BAZON

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

Efeito do alérgeno Poly p 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) na modulação do fenótipo funcional de macrófagos intraperitoneais murinos.

MURILO LUIZ BAZON

Orientadora: Dr^a. Márcia Regina Brochetto-Braga

Co-orientadora: Dr^a. Patrícia Ucelli Simioni

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

B364e	Bazon, Murilo Luiz Efeito do alérgeno Poly p 5 do veneno de <i>Polybia paulista</i> (Hymenoptera, Vespidae) na modulação do fenótipo funcional de macrófagos intraperitoneais murinos. / Murilo Luiz Bazon. -- Rio Claro, 2021 103 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Márcia Regina Brochetto-Braga Coorientadora: Patrícia Ucelli Simioni 1. Hymenoptera. 2. <i>Polybia paulista</i>. 3. Antígeno 5. 4. Efeito inflamatório. 5. Macrófagos. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E INFLAMATÓRIA DOS EFEITOS DO ANTÍGENO 5 DO VENENO DE *Polybia paulista* (HYMENOPTERA, VESPIDAE) NA FORMA RECOMBINANTE, SOBRE MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS MURINOS

AUTOR: MURILO LUIZ BAZON

ORIENTADORA: MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA

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

Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Prof. Dr. RICARDO DE LIMA ZOLLNER (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Médica / UNICAMP

Prof. Dr. FERNANDO ARARIPE GONÇALVES TORRES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Celular / Universidade de Brasília

Prof. Dr. LUIS GUSTAVO ROMANI FERNANDES (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

Rio Claro, 03 de maio de 2021



Título alterado para: "Efeito do alérgeno Poly p 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) na modulação do fenótipo funcional de macrófagos intraperitoneais murinos"

Dedico este trabalho aos meus pais, **Sebastião Bazon** e **Suseli Bazon**, à minha irmã **Aline Bazon**, ao meu cunhado **Fernando Cunha**, à minha sobrinha **Cecília Cunha**, à minha avó querida **Izaltina Leance** e, à minha companheira **Isabela Assugeni**, 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 vó Alzira (em memória), sem vocês eu nada seria. Sei que cuidam de mim onde quer que estejam e sempre serão lembrados como a melhor parte da minha vida.

À minha orientadora, Dr^a. 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.

À minha co-orientadora Dr^a. Patrícia Ucelli Simioni, pela ajuda e suporte ao projeto.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Imunologia Translacional da UNICAMP. Em especial ao Dr. Luis Gustavo Romani Fernandes e ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, por todo apoio, ensinamento e suporte ao projeto.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2017/07988-2, pela concessão de bolsa no país; à FAPESP, processo nº 2019/02298-3, pela concessão de bolsa no exterior, que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de Levedura da UnB, em especial ao Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, por todo suporte e acolhimento.

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. Em especial aos colegas, Dr. Amilcar Perez-Riverol, Dr. José Roberto e Dr. Mário Palma.

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

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.

Aos amigos que a Pós-Graduação me deu: Camila Pansa, Lucas Pinto e Letícia Rocha.

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

À minha sobrinha Cecília, pelas risadas e distrações em momentos de desespero.

À minha companheira de vida, Isabela Assugeni, pela paciência e por vivenciar essa jornada ao meu lado.

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.

RESUMO

A vespa social *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae), abundante no sudeste do Brasil, é extremamente agressiva, sendo responsável por diversas ocorrências médicas. Estudos com os componentes alergênicos deste veneno têm ganhado crescente interesse devido a resultados promissores de seu uso em diagnóstico laboratorial, bem como em protocolos clínicos de imunoterapia alérgeno específica. Dentre os componentes presentes no veneno de *P. paulista*, a proteína Antígeno 5 (Poly p 5) tem sido considerada um dos principais alérgenos presentes nessa espécie, que pertence à superfamília das proteínas secretoras ricas em cisteína (CAP). Apesar disso, sua função biológica como componente do veneno de Vespidae permanece desconhecida. Nesse contexto, foi analisada a possível modulação da resposta imune *in vitro* induzida pelo alérgeno Poly p 5, expresso na forma recombinante (rPoly p 5) em levedura *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), sobre macrófagos peritoneais extraídos de camundongos BALB/c, ativados e não ativados com estímulo pró-inflamatório (LPS). Para isto foram analisadas, nestas células, alterações de viabilidade celular, expressão da forma fosforilada de NF- κ B, produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas pró-inflamatórias, além da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. Os resultados indicam que rPoly p 5, na concentração de 1 μ g/mL, não afeta a produção de NO e não modula a expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em macrófagos peritoneais de camundongos, ativados ou não com LPS. Entretanto, o rPoly p 5 induziu um aumento de IL-1 β ($p=0,0463$) em macrófagos não estimulados com LPS e uma redução na produção das citocinas TNF- α ($p=0,0297$) e MCP-1 ($p=0,040$), quando estimulada com LPS. O alérgeno rPoly p 5 também diminuiu significativamente a produção *in vitro* da forma fosforilada p65 de NF- κ B ($p=0,0463$) em macrófagos, quando comparado ao grupo controle (sem LPS). A avaliação do potencial pró ou anti-inflamatório do alérgeno rPoly p 5, por meio da análise das respostas dos macrófagos intraperitoneais de camundongos, ainda não levou a uma compreensão clara do potencial imunomodulador desta proteína. Todavia, alguns achados podem indicar um papel importante deste alérgeno na polarização de fenótipos funcionais de macrófagos M2.

Palavras-chave: Antígeno 5; Hymenoptera; *Polybia paulista*; macrófagos; efeitos inflamatórios.

ABSTRACT

The social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae), abundant in southwestern Brazilian region, is extremely aggressive, being responsible for many medical occurrences. Studies with the allergenic components of this venom have gained increasing interest due to the promising results of its use in laboratory diagnosis, as well as in clinical protocols of specific allergen immunotherapy. One of the most allergenic components found in the *P. paulista* venom is the Antigen 5 (Poly p 5), which belongs to cysteine-rich secretory proteins (CAP) superfamily. Despite this, its biological function as a component of the Vespidae venom remains unknown. In this context, the possible modulation of the *in vitro* immune response induced by the allergen Antigen 5 from *P. paulista* venom, expressed in recombinant form (rPoly p 5) in yeast *Komagataella phaffi* (*Pichia pastoris*), on peritoneal macrophages extracted from BALB / c mice was analyzed, activated and not activated with pro-inflammatory stimulus (LPS). For this purpose, were analyzed, in these cells, cell viability changes, expression of the phosphorylated form of NF- κ B, nitric oxide (NO) and proinflammatory cytokines, in addition to expression of costimulatory molecules CD80 and CD86. The results indicate that rPoly p 5, at a concentration of 1 μ g / mL, does not affect NO production and does not modulate the expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 in mouse peritoneal macrophages, activated or not with LPS. However, rPoly p 5 induced an increase in IL-1 β ($p=0,0463$) in macrophages not stimulated with LPS and a reduction in the production of cytokines TNF- α ($p= 0,0297$) and MCP-1 ($p=0,040$), when stimulated with LPS. The rPoly p 5 allergen also significantly decreased the *in vitro* production of the phosphorylated form p65 of NF- κ B in macrophages, when compared to the control group (without LPS). The evaluation of the pro or anti-inflammatory potential of the rPoly p 5 allergen, by analyzing the responses of the intraperitoneal macrophages of mice, has not yet led to a clear understanding of the immunomodulatory potential of this protein. However, some findings may indicate an important role for this allergen in the polarization of functional M2 macrophage phenotypes.

Keywords: Antigen 5; Hymenoptera; *Polybia paulista*; macrophages; inflammatory effects.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> para expressão do alérgeno Poly p 5.	44
Tabela 2. Acompanhamento do nível de expressão da proteína alergênica rPoly p 5 em <i>K. phaffii</i>	59
Tabela 3. Análise do sequenciamento de rPoly p 5.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomia de Hymenoptera	17
Figura 2. Distribuição da vespa social <i>Polybia paulista</i> na América do Sul	19
Figura 3. Reação de Hipersensibilidade do tipo I.....	23
Figura 4. Classificação fenotípica dos macrófagos.	29
Figura 5. Genes alvo de NF- κ B envolvidos no desenvolvimento e progressão da inflamação	38
Figura 6. Amplificação do cDNA de Poly p 5 e Digestão vetor pPICZ α -A.....	55
Figura 7. Digestão vetor recombinante pPICZ α -A + poly p 5.....	56
Figura 8 . Construção X-33/pPICZ α A-poly p 5 em YPD-ágar.	57
Figura 9. Representação gráfica do perfil eletroforético poly p 5 obtida por PCR de colônia gene-específico com os <i>primers</i> Poly p 5_F e Poly p 5_R..	58
Figura 10. Placa contendo colônias de X-33/pPICZ α A-poly p 5.	59
Figura 11. Análise de SDS-PAGE da expressão de rPoly p 5 em <i>K.phaffii</i> induzida a 28°C com metanol (1%)..	60
Figura 12. Purificação do alérgeno recombinante rPoly p 5 por cromatografia de afinidade em Ni-NTA agarose e análise das frações eluídas da coluna.....	61
Figura 13. Análise de glicosilação e deglicosilação de rPoly p 5 com PNGase-F. ...	62
Figura 14. Proteína rPoly p 5 tratada com Enteroquinase..	63
Figura 15. Análise de viabilidade celular de cultura de linhagem macrofágica J744 e RAW 264.7 após tratamento com diferentes concentrações de rPoly p 5.....	65
Figura 16. Efeito do rPoly p 5 na produção de óxido nítrico por macrófagos intraperitoneais da linhagem BALB/c.	67
Figura 17. Produção de citocinas TNF- α , MCP-1 e IL-1 β nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais BALB/c estimulados com 1 μ g/mL de rPoly p 5 na ausência ou presença de 1 μ g/mL de LPS.	69

Figura 18. Produção de citocinas IL-6, IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais BALB/c estimulados com 1 μ g/mL de rPoly p 5 na ausência ou presença de 1 μ g/mL de LPS.	70
Figura 19. Produção de citocinas IFN- β , IL-1a e IL-27 nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais BALB/c estimulados com 1 μ g/mL de rPoly p 5 na ausência ou presença de 1 μ g/mL de LPS.	71
Figura 20. Produção de citocinas GM-CSF, IL-12p70 e IL-17a nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais BALB/c estimulados com 1 μ g/mL de rPoly p 5 na ausência ou presença de 1 μ g/mL de LPS.	72
Figura 21. Expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 em células de macrófagos intraperitoneais de camundongos estimulados com 1 μ g/mL de rPoly p 5.	74
Figura 22. Expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e MHCII em células de macrófagos intraperitoneais de camundongos estimulados com rPoly p 5..	75
Figura 23. Expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e MHCII em células de macrófagos intraperitoneais de camundongos estimulados com rPoly p 5 e 1 μ g/mL LPS.	76
Figura 24. Análise da forma ativada de NF-kB em macrófagos intraperitoneais de camundongos estimulados com 1 μ g/mL de rPoly p 5, na ausência ou presença de LPS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetronila
Ag5 – Antígeno 5
APC – Aloficocianina
APCs – Células apresentadoras de antígeno
ARG - Arginase
BAT - Teste de ativação de basófilos
BMGG – Buffered methanol-complex medium
BMGY – Buffered glycerol-complex medium
BSA - Soro albumina bovina
CCDs – Determinantes de carboidratos de reatividade cruzada
CD - Cluster of differentiation
CTLA-4 - Proteína associada à linfócitos T citotóxicos 4
DCs - Células dendríticas
DMSO - Dimetilsulfoxido
DTT – Ditionitrito
FBS - Soro fetal bovino
FcεRI - Receptores Fc epsilon I
FITC - Isotiocinato de fluoresceína
GM - CSF - Fator estimulador de colônia de granulócito/ macrófago
HBSS - Solução salina balanceada de Hank's
IFN-γ - Interferon gamma
Ig - Imunoglobulina
IKK – Complexo de quinase IκB
IL- Interleucina
iNOS- óxido nítrico sintase induzível
IRAK - Quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1
LB – Luria Bertani
LPS - Lipopolissacarídeo
MCP-1/CCL2 – Proteína-1 quimioatraente de monócitos
MHC - Complexo de histocompatibilidade principal
MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 bromídeo difeniltetrazolio
MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88

NFκB - Fator nuclear de ativação kappa B
NK – Célula Natural Killer
NO - Óxido nítrico
PAMPs – Padrões moleculares associados a Patógenos
PBS - Salina tamponada
PCR – Reação em cadeia da Polimerase
PE - Ficoeritrina
PerCP - Proteína peridina Clorofila-a
Poly p 5 – Antígeno 5 de *Polybia paulista*
RNS – Espécies reativas de nitrogênio
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
rPoly p 5 – Antígeno 5 recombinante de *Polybia paulista*
SDS - Dodecilsulfato de sódio
TCR - Receptor de células T
TFA – Ácido Trifluoroacético
TGF - Fator transformador de crescimento
Th1 - Linfócitos T helper tipo 1
Th2 - Linfócitos T helper tipo 2
TLR - Receptor do tipo toll
TNF - Fator de necrose tumoral
Tregs - Células T reguladoras
VIT - *Venom immunotherapy*
YPD – *Yeast extract peptone Dextrose*

SUMÁRIO

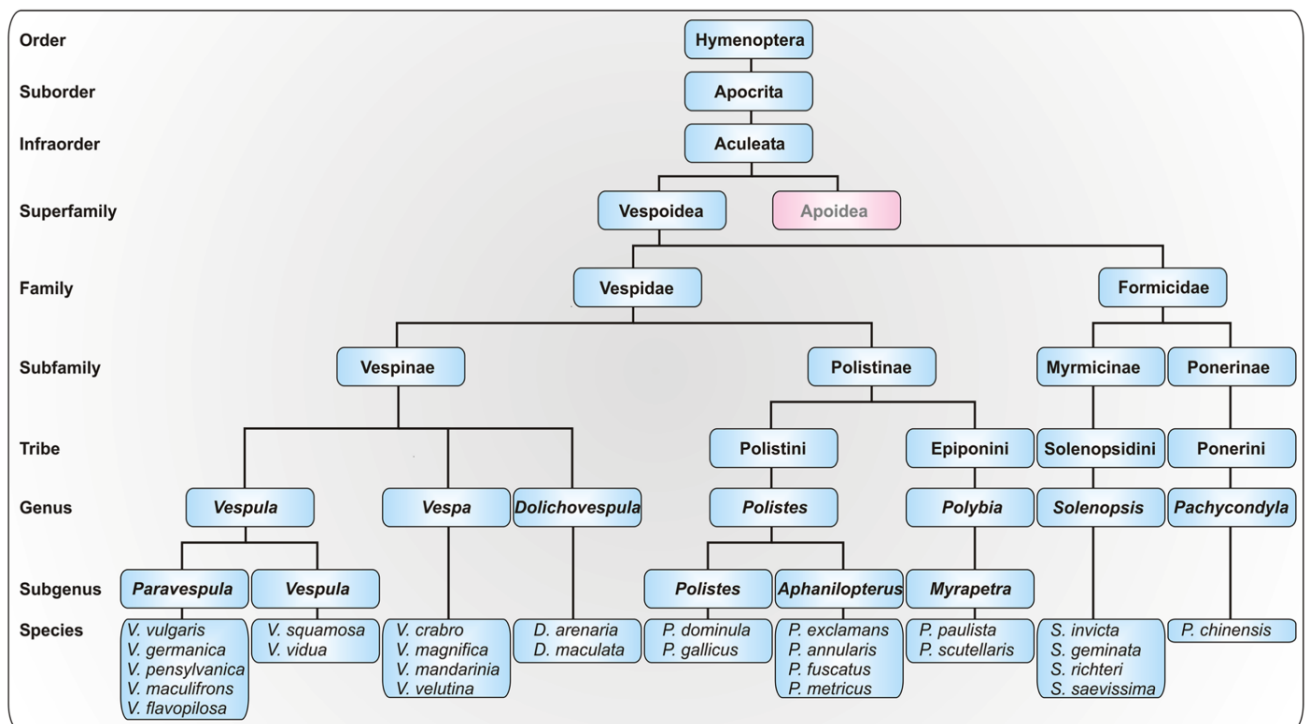
1. Introdução	17
1.1. Antígeno 5	19
1.2. Reações de hipersensibilidade a venenos de vespa	21
1.3. Macrófagos	25
1.3.1 Macrófagos M1 e M2	28
1.4 Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias	30
1.5 Moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86	35
1.6 Óxido Nítrico	36
1.7 NF-kB	37
2. Justificativa	40
3. Objetivo	41
3.1. Objetivos específicos	41
4. Material e Métodos	42
4.1. Macrófagos	42
4.2. Reagentes	42
4.3. Eletroforese de Proteínas	43
4.4. Obtenção do rPoly p 5	43
4.4.1. Desenho dos <i>primers</i> e amplificação de Poly p 5	43
4.4.2. Digestão pPICZ α -A e clonagem in-fusion do cDNA de Poly p 5	45
4.4.3. Extração (“mid-prep”) do DNA plasmidial (pPICZ α -A+poly p 5)	46
4.4.4. Clonagem da construção pPICZ α -A+poly p 5 em <i>Komagataella phaffii</i>	46
4.4.5. Expressão do rPoly p 5 em <i>Komagataella phaffii</i>	47
4.4.6. Purificação de rPoly p 5	48
4.5. Análise de glicosilação rPoly p 5	48
4.6. Sequenciamento da proteína rPoly p 5	49
4.6.1. Análise proteômica com a estratégia do tipo Shotgun	49
4.6.2. Análises de espectrometria de massas	49
4.6.3. Identificação da proteína	50
4.7. Enteroquinase	51
4.8. Cultura de células de macrófagos	51
4.9. Avaliação da viabilidade celular em células de linhagem macrofágica J774 e RAW 264.7	51
4.10. Quantificação da concentração de nitrito nos sobrenadantes de cultura de macrófagos intraperitoneais de camundongos	52
4.11. Avaliação dos marcadores celulares de macrófagos intraperitoneais	52

12. Quantificação de citocinas nos sobrenadantes das culturas.	53
4.13. Análise de NF- κ B	49
4.14. Análise estatística	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1. Clonagem, expressão e purificação de rPoly p 5 em <i>K. phaffii</i>	55
5.1.1. Amplificação de poly p 5 (pUC57), digestão do vetor pPICZ α -A e clonagem <i>in-fusion</i>	55
5.1.2. Extração do DNA plasmidial e clonagem da construção pPICZ α -A+poly p 5 em <i>K. phaffii</i>	56
5.1.3. Expressão e purificação do alérgeno rPoly p 5 em <i>K. phaffii</i>	58
5.2. Avaliação de viabilidade em J774 e RAW 264.7	64
5.3. Quantificação de Óxido nítrico.....	66
5.4. Análise de citocinas pró e anti-inflamatórias	67
5.5 Análise de moléculas co-estimulatórias.....	73
5.6. Análise de NF- κ B	76
6. Discussão	78
7. Conclusão	89
8. Perspectivas futuras	90
Referências:.....	91
ANEXOS	104

1. Introdução

A ordem Hymenoptera (subordem Apocrita, grupo Aculeata) é o principal grupo que compõe as maiores famílias entre os insetos, sendo dividido em três principais famílias: Vespidae (compreendendo os gêneros *Vespas*, *Vespulas* e *Polistes*), Formicidae (formigas) e Apidae (abelhas e mamangavas) (HOFFMAN, 2006) (**Figura 1**). Compreende mais de 153.000 espécies descritas e possivelmente até um milhão de espécies existentes não descritas (AGUIAR, et al., 2013). Como parasitoides, predadores e polinizadores, os Hymenoptera desempenham um papel fundamental em todos os ecossistemas terrestres e são de substancial importância econômica

Figura 1. Taxonomia de Hymenoptera



(GRIMALDI, et al., 2005).

Fonte: BLANK et al., 2020.

As ferroadas desses insetos causam reações inflamatórias locais e sistêmicas, como dor, edema e vermelhidão. Nessas reações, os alérgenos do veneno desencadeiam respostas do sistema imune com a produção de anticorpos específicos, bem como pela degranulação de mastócitos e envolvimento de células como macrófagos e linfócitos (BORDON et al., 2015). A concentração do veneno varia de acordo com cada espécie e, nesse contexto, deve também ser levado em

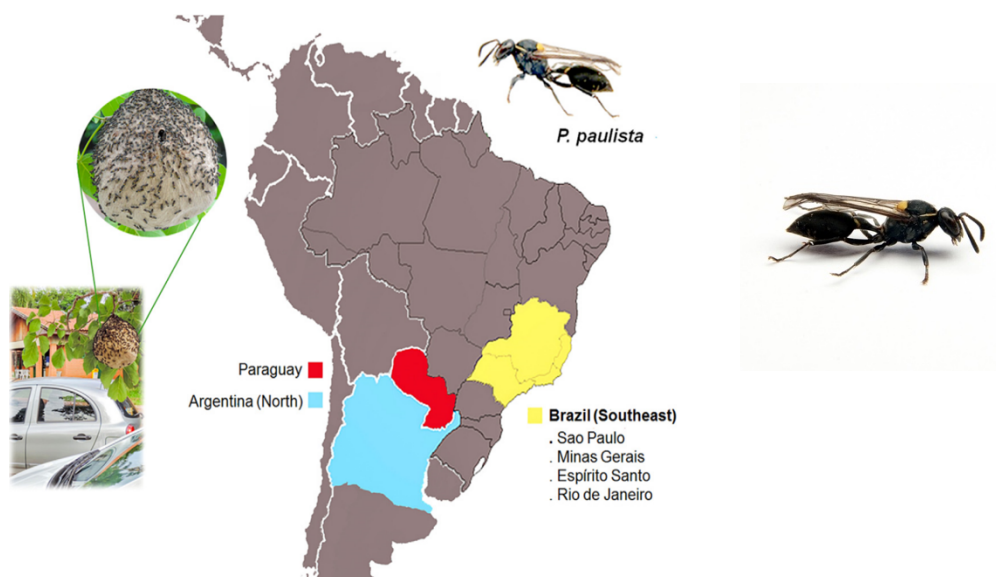
consideração a quantidade de veneno ao qual a vítima foi exposta e o seu nível de sensibilidade individual aos alérgenos (SOLOMON et al., 2014; BILÒ et al., 2016). Em estágios mais graves, a resposta imune pode levar a processos inflamatórios sistêmicos graves (anafilaxia fatais). Além disso, as reações respiratórias e circulatórias são comuns em quadros alérgicos (HAMILTON, 2004; SOLOMON, et al., 2014; WOLVERTON; BEAKES; HUEBNER, 2013).

Estudos epidemiológicos estimam que 56,6% - 94,5% das populações humanas foram, pelo menos uma vez na vida, ferroadas por Hymenoptera (ANTONICELLI, et al., 2002). A prevalência de reações alérgicas sistêmicas relacionadas ao veneno de Hymenoptera é de 0,3–8,9%, com anafilaxia ocorrendo em 0,3–42,8% dos casos (BILÒ, 2011).

O Brasil abriga cerca de 320 espécies de vespas sociais que representam 57% e 33% das espécies atualmente descritas na América Latina (552) e no mundo (974), respectivamente (LOCHER, et al., 2014). Os dados epidemiológicos atualmente disponíveis sugerem que ocorrem anualmente, no Brasil, de 10 a 15 mil acidentes com picadas de abelhas e / ou vespas. A maioria deles é causada pela vespa social *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) com 35-42 mortes registradas a cada ano (SVS, 2017)

A vespa social *Polybia paulista* (*P. paulista*), também conhecida popularmente como “paulistinha” é muito comum no Sudeste do Brasil, principalmente no Estado de São Paulo, sendo relatada também em parte da Argentina e Paraguai (**Figura 2**), e tem sido responsável pelo crescente número de acidentes registrados. Isto se explica pelo fato que estas vespas se adaptaram a áreas urbanas como refúgio, devido ao desmatamento das florestas, construindo seus ninhos em cidades junto às áreas residenciais (AGUIAR, 2006). Esta é uma das vespas sociais mais agressivas, sendo responsável por inúmeros acidentes de importância médica, o que justifica a necessidade de caracterização dos principais compostos proteicos e alergênicos de seu veneno. Reações sistêmicas provocadas por *P. paulista* representam entre 9 a 23% dos casos de reações de hipersensibilidade (JACOMINI, 2013; JUSTO JACOMINI et al., 2014). Infelizmente, a grande maioria dos acidentes e a prevalência de alergias a venenos de Hymenoptera foram negligenciados por décadas no Brasil, em consequência da falta de dados coletados pelas instituições de saúde e de análises de pesquisas.

Figura 2. Distribuição da vespa social *Polybia paulista* (paulistinha) na América do Sul.



Fonte: PEREZ-RIVEROL, et al., 2017

1.1. Antígeno 5

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).

Entre os componentes presentes no veneno de *P. paulista*, a proteína denominada Antígeno 5 (Ag5 - em termos gerais ou nPoly p 5 / Poly p 5- especificamente para o alérgeno nativo do veneno *P. paulista*) tem sido considerada um dos principais alérgenos presente nesta espécie, juntamente com a Hialuronidase (Poly p 2) e Fosfolipase A1 (Poly p 1). O Ag5 representa um dos mais importantes alérgenos de veneno em quase todas as espécies de Vespoidea relevantes para manifestação de processo alérgico. Embora os alérgenos Ag5 sejam as proteínas

mais abundantes na maioria dos venenos de Vespoidea, sua função dentro dos venenos permanece bastante inexplorada (BLANK et al., 2020).

O Ag5 de *Polybia paulista* (Poly p 5) apresenta massa molecular em torno de 23 kDa, com 207 resíduos de aminoácidos, sendo que 8 desses resíduos referem-se a cisteínas, responsáveis pela formação de 4 pontes de dissulfeto e ponto isoelétrico em torno de 9,0 (CASCONI et al., 1995). Utilizando uma abordagem proteômica, foram identificadas 7 isoformas para o Poly p 5 no veneno da vespa *P. paulista*. A isoforma mais abundante foi extensivamente analisada por espectrometria de massas, tendo assim várias de suas modificações pós-traducionais determinadas. Seu modelo estrutural apresentou três hélices- α , uma hélice 3_{10} , e quatro folhas- β , cobrindo 28 e 17,9% de sua sequência (SANTOS et al., 2010; BAZON et al., 2017).

Curiosamente, uma nova alternativa para o desenvolvimento de imunoterapia definida molecularmente foi sugerida recentemente após a descrição de vários epítopos lineares de células B de Poly p 5 (SANTOS et al., 2014). Combinando a técnica de síntese SPOT e a modelagem estrutural de Poly p 5, os autores identificaram nove epítopos lineares de linfócitos B que foram imunorreativos para IgG humana, um dos quais, o peptídeo 7 (WAKTKE) que também reage com IgE humana. O uso de peptídeos sintéticos com base nos epítopos descritos pode fornecer uma estratégia segura e eficaz para induzir tolerância nos pacientes alérgicos sem a ocorrência de efeitos adversos (INCORVAIA et al., 2016).

A proteína alergênica Ag5 apresenta sequência homóloga com outras proteínas de diversos tecidos, tais como proteínas de testículos de mamíferos, tumor de cérebro humano e folhas de plantas de tomate e tabaco. Esse antígeno pertence a uma superfamília denominada CAP, composta por proteínas ricas em resíduos de cisteína (CRISP), e por proteínas relacionadas à patogênese-1 (Pr-1). Em insetos que se alimentam de sangue, como: carrapatos, moscas e mosquitos, as proteínas Ag5 são parte de uma mistura de proteínas salivares que atuam na supressão do sistema imunológico do hospedeiro ou na prevenção da agregação plaquetária (RIBEIRO, et al., 2003). Entretanto, a função biológica do Ag5, principalmente nos venenos de Hymenoptera após a ferroada, ainda permanece desconhecida. Ensaios em animais já demonstraram que o Ag5 não possui ação tóxica, embora possa estar associado às respostas de hipersensibilidade (BILÒ; BONIFAZI, 2009; DEMAÏN; MINAEI; TRACY, 2010).

Os alérgenos Ag5 são valiosos marcadores para discriminar alergia entre abelhas da espécie *Apis mellífera* e alergia provocada por diferentes vespas. Embora uma proteína semelhante ao Ag5 tenha sido identificada em nível transcriptômico nas glândulas de veneno de abelhas de inverno (e não encontrado nas abelhas de verão), o produto da proteína codificada não mostra reatividade cruzada com o Ag5 de *Vespula vulgaris* (VAN VAERENBERGH et al., 2013). Em contraste, os alérgenos Ag5 de várias espécies de Vespoidea exibem elevada identidade de sequência aminoácidos, similaridade estrutural e reatividade cruzada, ambas mensuradas pelos testes de imunoglobulina específica (sIgE) e ativação de basófilo (SCHIENNER et al., 2017). Portanto, as proteínas Ag5 não são alergênicas confiáveis para diferenciar na identificação entre o processo alérgico promovidas entre espécies de vespas. Até o momento, apenas os alérgenos Ag5 de *Vespula vulgaris* (Ves v 5) e *Polistes dominula* (Pol d 5) estão comercialmente disponíveis para diagnósticos de rotina (BLANK et al., 2020).

A alergenicidade do Ag5 de venenos de Hymenoptera e a falta de conhecimento sobre suas possíveis atividades enzimática ou outras atividades fisiológicas têm incentivado esforços para a produção heteróloga desse alérgeno. Além de auxiliar no diagnóstico de alergia e imunoterapia, as formas recombinantes do Ag5 poderiam ser utilizadas em diferentes ensaios para caracterização estrutural e funcional. O entendimento da ação desta proteína sobre células do sistema imune é uma abordagem pouco explorada na literatura e que se faz necessária para compreensão de sua atividade. O estudo e a caracterização de diferentes componentes proteicos de venenos de insetos se tornam muito importante para que seja possível a melhoria dos métodos diagnósticos, proporcionando um entendimento mais preciso, tanto dos padrões de especificidade, como de reatividade cruzada entre os diferentes alérgenos (MÜLLER, 2010).

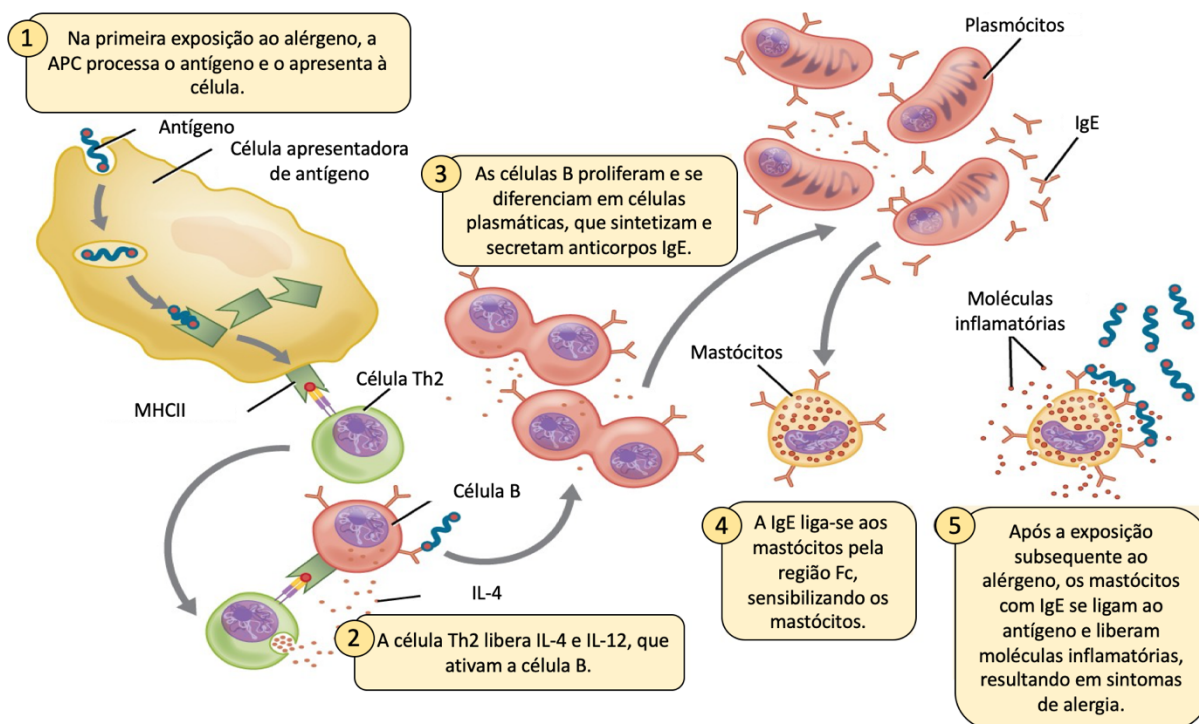
1.2. Reações de hipersensibilidade aos venenos de vespa

As reações alérgicas são descritas como reações de hipersensibilidade iniciadas por mecanismos imunológicos (TANNO et al., 2015). Reações de hipersensibilidade generalizada podem ocorrer a partir de minutos após a ferroadada e se apresentam como prurido, urticária, angioedema, náuseas, vômitos, diarreia, rinoconjuntivite, broncoespasmo, hipotensão, colapso cardiovascular e inconsciência

que podem ser observadas em indivíduos alérgicos (de GRAAF et al., 2009). Em geral, os venenos de vespas podem promover a reação de hipersensibilidade tipo I, cuja resposta é dependente de IgE. A hipersensibilidade do tipo I é uma resposta imediata, caracterizada por uma reação antígeno-anticorpo, tendo como consequência alterações teciduais e vasculares. (DE GRAAF et al., 2009; TANNO et al., 2015).

Em indivíduos alérgicos, uma única ferroada poderá desencadear reações graves e fatais (BLANK et al., 2019). Essas reações mediadas por IgE dependem de uma etapa inicial de sensibilização. Durante o encontro com componentes alérgicos do veneno por meio da ferroada, introduzindo os alérgenos do veneno no organismo. Células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas, linfócito B ou macrófagos, incorporam, processam e, subsequentemente, apresentam os alérgenos aos linfócitos T CD4 + virgens, por meio de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II e receptores de linfócitos T (TCR). Esses linfócitos T se diferenciam em células efectoras T_h1 , T_h2 ou T_h17 ou assumem uma função reguladora como linfócitos T reguladores (Treg). A troca de classe de linfócito B e a diferenciação em células plasmáticas produtoras de IgE são induzidas pelas citocinas IL-4 e IL-13, que são secretadas por linfócitos Th2 maduros. Após a sensibilização, a reação alérgica poderá ocorrer se os receptores para a fração cristalizável (Fc) épsilon I ($Fc\epsilon RI$) na superfície dos mastócitos e basófilos, ancorados com anticorpos IgE específicos para alérgenos, forem reticulados durante um encontro posterior com os alérgenos. Isso, por sua vez, leva à degranulação de mastócitos e basófilos e à secreção de compostos pró-inflamatórios, como histamina, proteases, citocinas e mediadores lipídicos. Esta mistura de compostos imunológicos ativos leva à indução de sintomas alérgicos em pacientes suscetíveis (RINDSJO et al., 2010) (**Figura 3**).

Figura 3. Reação de Hipersensibilidade do tipo I - Na primeira exposição a um alérgeno em um indivíduo suscetível, células apresentadoras de antígeno processam e apresentam epítomos de alérgeno com complexo de histocompatibilidade principal (MHC) II para linfócitos T auxiliares. As células B também processam e apresentam o mesmo epítipo de alérgeno ao linfócitos Th2, que liberam as citocinas IL-4 e IL-13 para estimular a proliferação e diferenciação em células plasmáticas secretoras de IgE. As moléculas de IgE se ligam aos mastócitos com sua região Fc, sensibilizando os mastócitos para ativação com subsequente exposição ao alérgeno.



Fonte: Adaptado de <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/hypersensitivities/>

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 e pelo baixo nível de sensibilidade do teste *Radioallergosorbent* (RAST). Além disso, os soros de pacientes sensibilizados podem apresentar múltiplas reatividades (30–50%) e apresentar reações cruzadas com outros venenos de Hymenoptera (60–70%) (KRISHNA et al., 2011). Essas reações podem ocorrer devido a vários fatores, como níveis elevados de IgE específica, independente da sensibilização a cada veneno; anticorpos IgE com reatividade cruzada com proteínas homólogas presentes em venenos ou pela ligação de anticorpos IgE a regiões determinantes de carboidratos (CCDs) (MOITINHO et al., 2020).

A imunoterapia específica para veneno (VIT) é atualmente a única terapia com a indução de tolerância, mas sua eficácia depende da identificação correta do inseto e do componente alergênico que faz parte do veneno. No entanto, em alguns pacientes, não é possível realizar um diagnóstico adequado, apesar de anamnese completa, testes de alergia cutânea, dosagem de IgE específica (sIgE) para extratos de veneno total e testes celulares como, por exemplo, o teste de ativação de basófilos (BAT) (BILÒ et al., 2019). Um dos principais obstáculos para se obter um tratamento eficaz para as respostas de hipersensibilidade está na ocorrência de reações inespecíficas ou não definidas, ou seja, quando o paciente apresenta uma reação alérgica cruzada entre diferentes alérgenos de venenos de vespas, de vespa e abelha, ou ainda entre vespa e formiga. Isso ocorre, como mencionado acima, devido à alta similaridade entre as sequências primárias das proteínas alergênicas (BALDACCI; OMENAAS; ORYSZCZYN, 2001). Uma abordagem para resolução destes problemas é melhorar os diagnósticos resolvidos por componentes (CRD) adicionando novos alérgenos recombinantes à paleta de diagnóstico (BLANK et al., 2020).

Até o momento, o CRD aumentou a sensibilidade da detecção de sIgE e possibilitou a discriminação entre a sensibilização primária e a reatividade cruzada, particularmente em pacientes com sensibilização tanto ao veneno de abelha quanto ao veneno de vespa. Portanto, o CRD melhora a seleção da intervenção imunoterapêutica apropriada. Além disso, o conhecimento detalhado sobre os perfis de sensibilização em nível molecular pode abrir novas opções para identificar pacientes que apresentam maiores riscos de efeitos colaterais ou não respondem à imunoterapia (BLANK et al., 2018).

Apesar da grande diversidade de Hymenoptera social identificada no Brasil, nenhum material alergênico definido por componente está disponível para o diagnóstico específico de alergia. Atualmente, o diagnóstico do HVA (*Hymenoptera Venom Allergy*) é baseado na utilização de extratos brutos de veneno de espécies nativas ou de alérgenos comercializados provenientes de insetos do Hemisfério Norte.

O uso de venenos brutos aumenta a incidência de reatividade cruzada devido à presença de determinantes de carboidratos de reatividade cruzada (CCDs) (MERTENS et al., 2010). Enquanto isso, o diagnóstico de pacientes brasileiros é, muitas vezes, realizado com alérgenos de Hymenopteros de outras regiões, utilizando extratos comerciais de vespas endêmicas da Europa ou América do Norte, que podem

levar a diminuição na sensibilidade, comprometendo assim a eficácia e o perfil de segurança da imunoterapia específica (SIT). A inclusão de alérgenos não relevantes na imunoterapia leva à sensibilização não específica dos pacientes e pode causar efeitos colaterais sistêmicos com risco de vida (BONIFAZI et al., 2005). A incidência de efeitos colaterais adversos durante a imunoterapia foi estimada em 25,1% e 5,8% para os venenos de abelhas e vespídeos, respectivamente (INCORVAIA et al., 2011). De modo geral, esses fatos impõem desafios significativos para o objetivo de diminuir a morbidade associada a acidentes com ferroadas e alergia à venenos de Hymenoptera no Brasil.

A diversidade de substâncias que compõem os venenos, bem como o escasso conhecimento do potencial imunológico de seus componentes alergênicos, a exemplo da proteína Antígeno 5, torna relevante a realização de mais estudos que venham elucidar todos os processos envolvidos tanto na sensibilização do indivíduo ferroadado, bem como, na busca de definir métodos de imunoterapia visando a supressão da alergia (STEEN et al., 2005).

1.3. Macrófagos

O sistema imunológico tem sido tradicionalmente dividido em componentes inatos e adaptativos, cada um com uma função e papel diferentes (DUQUE et al., 2014).

A imunidade inata é caracterizada pelo rápido reconhecimento dos microrganismos, porém, esse reconhecimento é pouco detalhado, pois é considerado mecanismo de baixa especificidade devido a sua natureza estereotípica (ação similar contra todos os antígenos) (CRUVINEL et al., 2010).

A imunidade adaptativa baseia-se em reações antígeno-anticorpo específica através de linfócitos T e B, e é somente ativada após o primeiro contato com o agente estranho ao organismo, desenvolvendo assim uma memória imunológica. Portanto, exposições subsequentes levam à reação mais rápida e intensa, mas não imediata (LIMA et al., 2007).

Moléculas como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicóicos, comumente encontradas na superfície de microrganismos, constituem Padrões

Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), dentre os quais a família dos receptores “Toll-like” (TLRs). Essa interação é semelhante à complementaridade entre antígeno e anticorpo ou entre antígeno e receptor de linfócitos T (TCR), mas, nesse caso, não há diversidade nem capacidade adaptativa para a geração de novos receptores ou reconhecimento de novos padrões moleculares que não aqueles já programados no código genético (CRUVINEL et al., 2010).

Monócitos e macrófagos teciduais em suas diversas formas compõem o sistema de fagócitos mononucleares (ABBAS, et al., 2018). As células do sistema fagocitário mononuclear se originam na medula óssea, circulam no sangue, amadurecem e se tornam ativados em vários tecidos. O primeiro tipo de célula que entra no sangue periférico, após deixar a medula, não é completamente diferenciado e é chamado de monócitos. Quando o monócito atinge o tecido extravascular, ele sofre transformação em uma célula fagocítica maior, o macrófago. Além de aumentar a atividade fagocítica, os macrófagos têm o potencial de serem ativados, um processo que resulta em aumento do tamanho da célula, aumento da produção de enzimas lisossomais, metabolismo mais ativo e maior capacidade de fagocitar e matar microrganismos ingeridos (FUJIWARA et al., 2005).

Uma vez que se instalam nos tecidos, essas células amadurecem e se tornam macrófagos. Os macrófagos podem apresentar diferentes morfologias e propriedades funcionais após a ativação por estímulos externos, incluindo microrganismos. Alguns desenvolvem citoplasma abundante e são chamadas de células epitelióides devido à semelhança morfológica com as células epiteliais da pele. Os macrófagos ativados podem se fundir para formar células gigantes multinucleadas. As células epiteliais e as células gigantes multinucleadas são o principal componente celular dos granulomas, um fenótipo típico da inflamação crônica. Os macrófagos são encontrados em todos os órgãos e tecidos conjuntivos e nomeados para designar sua localização, como células microgliais no sistema nervoso central, células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão e osteoclastos no osso (KOBAYASHI et al., 1996).

Os macrófagos têm pelo menos três funções principais: apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação (FIRESTEIN et al., 2004). As respostas

funcionais dos macrófagos na defesa do hospedeiro consistem em etapas sequenciais: recrutamento ativo das células para o local da infecção, reconhecimento de microrganismos, fagocitose e destruição de microrganismos ingeridos. Além disso, os macrófagos produzem moléculas biológicas ativas que desempenham muitos papéis importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas.

As células apresentadoras de antígenos (APC) funcionam para exibir antígenos para reconhecimento pelos linfócitos e para promover a ativação dos linfócitos. As células apresentadoras de antígenos incluem células dendríticas e monócitos / macrófagos. (FUJIWARA et al., 2005).

Os macrófagos expressam receptores que ativam as células para produzir citocinas, substâncias microbidas e receptores que estimulam a migração / quimiotaxia das células para os locais de infecção. Estes incluem receptores de manose, receptores “scavengers”, receptores para opsoninas, receptores acoplados à proteína de transmembrana e receptores TLRs (FUJIWARA et al., 2005).

O receptor de manose é uma lectina de macrófago que se liga a resíduos terminais de manose/fucose de glicoproteínas e glicolipídios nas paredes das células microbianas. Os receptores para opsoninas promovem a fagocitose de microrganismos revestidos com várias proteínas, incluindo anticorpos, proteínas do complemento e lectinas. Receptores Fc e receptores de complemento de macrófagos contribuem para o processo mediado por opsonina. Sete receptores acoplados à proteína de transmembrana G são expressos em leucócitos, reconhecem micróbios e certos mediadores que são produzidos em resposta a infecções e funcionam principalmente na migração / quimiotaxia de leucócitos para locais de infecção (TAKAEDA et al., 2003).

TLRs são uma família de proteínas transmembrana que atuam como receptores de reconhecimento de padrões para uma variedade de moléculas derivadas de microrganismos e estimulam respostas imunes inflamatórias / inatas aos microrganismos que expressam PAMPs. PAMPs que estimulam TLRs incluem lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas (TLR4), peptidoglicano, ácido lipoteicóico e lipoarabinomano de bactérias gram-positivas (TLR2), flagelina (TLR5) e motivos CpG não metilados (TLR9) (TAKAEDA et al., 2003).

A via de sinalização predominante usada pelos TLRs resulta na ativação de uma complexa cascata bioquímica. Essa interação promove o recrutamento de proteínas quinases como o Fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK) que culmina na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (FUJIWARA et al., 2005).

Os genes que são expressos em resposta à sinalização de TLR codificam proteínas importantes em componentes da resposta imune inata. Estes incluem citocinas pró-inflamatórias [interleucina (IL) -1, IL-12 e fator de necrose tumoral α (TNF- α)], moléculas de adesão endotelial e proteínas envolvidas em mecanismos microbicidas iNOS (óxido nítrico sintase induzível) (FUJIWARA et al., 2005).

1.3.1 Fenótipos funcionais de macrófagos

O microambiente em que um macrófago é encontrado fornece diversos sinais que desviam de forma divergente o fenótipo do macrófago para "classicamente ativado" (M1) ou "alternativamente ativado" (M2a, M2b ou M2c) (VANDEN EIJNDEN et al., 2005).

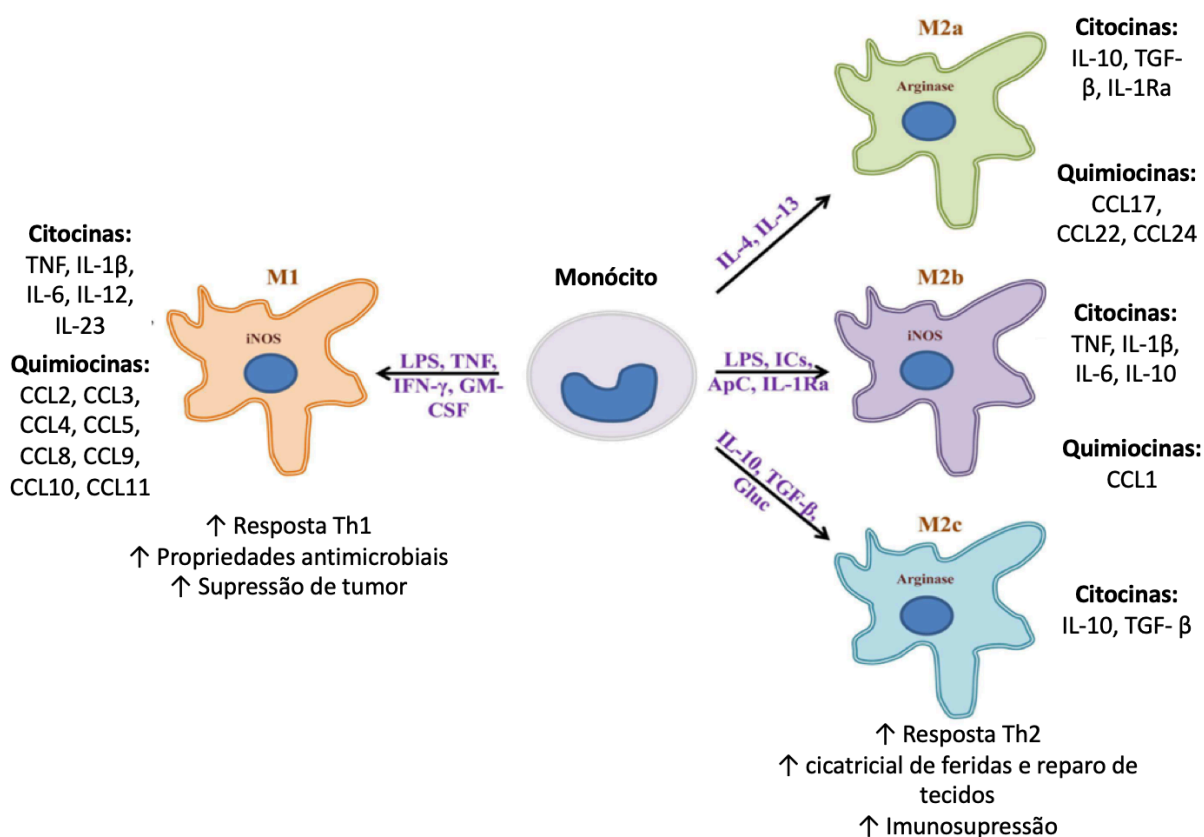
Os sinais de polarização podem ser células apoptóticas, hormônios, complexos imunes ou citocinas fornecidas por linfócitos ou outras células. A exposição de monócitos naïve ou macrófagos recrutados à citocinas Th1, como IFN- γ , TNF- α ou LPS, promove o desenvolvimento de M1. Esses macrófagos, por sua vez, secretam citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e promovem o desenvolvimento de linfócitos Th1. Além disso, os macrófagos M1 secretam altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), produzem e secretam iNOS e promovem o metabolismo da arginina em óxido nítrico e citrulina. Como resultado, os macrófagos M1 promovem um ambiente altamente microbicida e têm um papel na mediação da destruição de patógenos e células tumorais (DUQUE et al., 2014).

As quimiocinas derivadas de M1 ajudam a recrutar células NK (*Natural Killer*) e Th1. Em contraste, a exposição ou o tratamento de monócitos com IL-4 e IL-13 polariza essas células em direção a um fenótipo M2a (GUNDA et al., 2013). Esses macrófagos expressam uma série de quimiocinas que promovem o acúmulo de linfócitos Th2, eosinófilos e basófilos. Os macrófagos M2b são induzidos por pela

combinação de LPS, complexos imunes, células apoptóticas e IL-1Ra. Eles secretam altos níveis de IL-10, mas também citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 e expressam iNOS. Por meio da produção de quimiocinas, os macrófagos M2b também promovem o recrutamento de eosinófilos e linfócitos T reguladores (Tregs) que promovem uma resposta Th2. Os macrófagos M2c são induzidos por uma combinação de IL-10, $\text{TGF-}\beta$ e glicocorticoides. Por sua vez, esses macrófagos secretam IL-10 e $\text{TGF-}\beta$, ambas citocinas imunossupressoras que promovem o desenvolvimento de linfócitos Th2 e Tregs. Eles também expressam altos níveis de arginase e promovem a regeneração de tecidos e angiogênese (ZHANG et al., 2010).

A capacidade dos macrófagos M2c de induzir Tregs os torna mais eficazes do que os macrófagos M2a na proteção de órgãos de lesões causadas por infiltrados inflamatórios (LU et al., 2013). O enviesamento de macrófagos é reversível. Por exemplo, se um macrófago M1 recebe células apoptóticas, ele pode se transformar em um macrófago M2. Esquema ilustrado na **Figura 4**.

Figura 4. Perfis fenotípicos de macrófagos. Ao encontrar diferentes estímulos, os monócitos se transformam em macrófagos altamente microbicidas (M1) ou imunossupressores (M2). Os estímulos podem variar de substâncias provenientes de microrganismos a sinais bioquímicos fornecidos pelo microambiente de um determinado tecido.



As citocinas IL1, IL6, IL-12 e TNF- α possuem potencial inflamatório, enquanto as IL-10 e TGF- β atuam na modulação e inibição da resposta imune. O gene que codifica a enzima iNOS é controlado pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), o qual desempenha papel fundamental em respostas inflamatórias (PAHL, 1999; PFEILSCHIFTER et al., 1996). Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao promotor e ao *enhancer* dos genes promovendo uma coordenação da iniciação da transcrição gênica (XIAO, 2004). O NF- κ B é um fator de transcrição, envolvido na resposta imunológica, que regula expressão de genes essenciais no processo inflamatório e na defesa do organismo, além de ter participação na sobrevivência e proliferação celular (XIAO, 2004). Sabe-se que uma grande variedade de estímulos leva a ativação do NF- κ B, como, por exemplo, citocinas (TNF- α e IL-1), LPS, infecções virais e estresse oxidativo (ABBAS, et al., 2012; BOCHUD & CALANDRA, 2003).

A avaliação do potencial pró ou anti-inflamatório do Antígeno 5, pela análise da sua capacidade de estimular a produção de óxido nítrico e/ou secreção de citocinas é de relevância na compreensão do potencial imunomodulador dessa proteína.

1.4 Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias

Citocinas e quimiocinas são potentes moléculas de sinalização e são tão importantes para a vida quanto os hormônios e neurotransmissores. São proteínas de baixa massa molecular que medeiam a comunicação intercelular e são produzidas por muitos tipos de células, principalmente células do sistema imunológico. Elas foram descobertas entre os anos 60-70, e atualmente, mais de 100 proteínas diferentes são conhecidas como citocinas (DINARELLO et al., 2007).

Essas moléculas orquestram uma variedade de processos que vão desde a regulação da inflamação local e sistêmica até a proliferação celular, metabolismo, quimiotaxia e reparo de tecidos. A função primária das citocinas é regular a inflamação e, como tal, desempenham um papel vital na regulação da resposta imunológica. Existem citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (DUQUE et al., 2014).

A superfície celular possui um receptor específico para cada tipo de citocina. Quando ocorre a ligação, inicia-se uma cascata de sinalização celular que afeta a função da célula e regula positivamente e negativamente vários genes e seus fatores

de transcrição, resultando na produção de outras citocinas, aumento no número de receptores de superfície para outras moléculas ou, eventualmente, na supressão do próprio efeito da citocina.

Cada citocina é produzida por uma população de células em resposta a diferentes estímulos; eles induzem uma série de efeitos agonistas, sinérgicos ou antagônicos que alteram funcionalmente as células-alvo. Uma característica primária da biologia das citocinas é a redundância funcional: diferentes citocinas compartilham funções semelhantes. Além disso, as citocinas são pleiotrópicas, uma vez que atuam em muitos tipos de células diferentes, e as células podem expressar mais de um receptor para uma determinada citocina. Generalizar o efeito de uma citocina particular é virtualmente impossível. As citocinas são classificadas como parácrinas, autócrinas e endócrinas. A maioria das citocinas tem vida curta e age localmente de maneira autócrina e parácrina. Apenas algumas citocinas presentes no sangue, como eritropoietina (EPO), fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e fator estimulador de colônia de monócitos (M-CSF), são capazes de agir à distância (DUQUE et al., 2014).

As citocinas são essenciais para as funções dos macrófagos, que medeiam o desencadeamento de uma resposta imune eficaz, permite a interação entre a imunidade inata à adaptativa e influenciam o microambiente do macrófago (HUYNH et al., 2007). A seguir estão listadas algumas das principais citocinas moduladoras da resposta imune, dentre as quais: TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-1 α , IL-12, IFN- γ , IL-10, GM-CSF e MCP-1.

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma glicoproteína de 185 aminoácidos que foi inicialmente descrita por sua capacidade de induzir necrose em certos tumores e pela estimulação da fase aguda da resposta imunológica. Essa potente citocina pirogênica é uma das primeiras a ser liberada em resposta a um patógeno, podendo exercer seus efeitos em diversos órgãos, sendo uma das responsáveis pelo choque séptico (BEUTLLER et al., 1999). O TNF- α é um poderoso agente pró-inflamatório que regula a função dos macrófagos. É rapidamente liberado após trauma, infecção ou exposição a LPS derivado de bactérias e demonstrou ser um dos mediadores precoces mais abundantes no tecido inflamado (FELDMANN et al., 1994). Dentre as várias funções está o seu papel central em orquestrar a produção de cascata de citocinas inflamatórias, sendo considerado um "regulador mestre" (MAINI et al., 1995).

Além das citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α também aumenta os mediadores de transdução de sinal lipídico, como prostaglandinas e fator de ativação plaquetária (VASSALI, 1992).

IL-6 é uma citocina que se destaca por sua ação pleitrópica, possui funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que afetam processos que vão desde a imunidade até o reparo e metabolismo do tecido. A IL-6 pode ser secretada por vários tipos celulares, como macrófagos ativados, adipócitos e células musculares esqueléticas (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2002), atuando tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. A produção de IL-6 pode ser estimulada por citocinas como IL-1 β e TNF- α . Na imunidade inata, atua como estímulo para a produção de neutrófilos e de proteínas de fase aguda; já na imunidade adaptativa, atua na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, sendo também fator de crescimento de plasmócitos neoplásicos (YOON et al., 2009). A IL-6 pode ser considerada também uma citocina anti-inflamatória, inibindo a liberação de IL-1 β e TNF- α e favorecendo a produção do receptor de TNF- α solúvel. Por estas razões, a IL-6 tem sido considerada também uma citocina regulatória. Semelhante ao TNF- α e à IL-1 β , a IL-6 é um pirógeno endógeno que promove febre e a produção de proteínas de fase aguda do fígado, sua sinalização também leva ao recrutamento de monócitos para o local da inflamação (HURST et al., 2001), promove a manutenção das células Th17 e inibe a apoptose dos linfócitos T e o desenvolvimento de Tregs (SCHELLER et al., 2011).

Três formas de IL-1 são conhecidas: IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra. Embora IL-1 α e IL-1 β sejam fortemente pró-inflamatórias, desempenham muitas das mesmas funções e se ligam ao receptor de IL-1 (IL-1R), há apenas 25% de homologia de aminoácidos entre eles. Da mesma forma que o TNF- α , a IL-1 β também é um pirógeno endógeno que é produzido e liberado nos estágios iniciais da resposta imune a infecções, lesões e estresse. Embora monócitos e macrófagos sejam as principais fontes de IL-1 β , ela também é liberada por células NK, linfócitos B, células dendríticas, fibroblastos e células epiteliais. Durante a inflamação, IL-1 β estimula a produção de proteínas de fase aguda do fígado e atua no sistema nervoso central induzindo febre e secreção de prostaglandinas. Nos mastócitos, a IL-1 β induz a liberação de histamina, que por sua vez provoca vasodilatação e inflamação localizada. É também um quimioatratante para granulócitos, melhora a expansão e diferenciação de células T CD4 e aumenta a expressão de moléculas de adesão celular em leucócitos e células endoteliais. Além

disso, a IL-1 β aumenta a expressão dos genes que a produzem (DUQUE et al., 2014). Em baixa concentração, a IL- 1 β atua como mediadora de inflamação local, agindo nas células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de superfície que medeiam a adesão de leucócitos, como ligantes para integrinas (SIMS et al., 1994).

A família de citocinas IL-12 é responsável pela geração de linfócitos T (Th1), e sua secreção tem sido associada à imunidade inata, bem como ao desenvolvimento de imunidade adaptativa caracterizada pela indução da produção de IFN- γ . IL-12 é composta por duas subunidades covalentemente ligadas, IL-12p35 e IL-12p40. Quando expressas em conjunto, a IL-12p70 bioativa é formada. Os principais alvos celulares da IL-12 são as células T e as células NK. A ação da IL-12 nos linfócitos T e nas células NK tem vários efeitos: por um lado, os macrófagos são ativados pelo IFN- γ para produzir NO sintase e, subsequentemente, liberar espécies reativas de nitrogênio. Isso resulta em um aumento da função fagocítica e inflamação local. Por outro lado, a IL-12 conduz o desenvolvimento de células T naíve para células Th1 e impede a diferenciação de Th2 (ZUNDLER et al., 2015). Dois novos membros das citocinas da família IL-12 foram também caracterizados, IL-23 e IL-27 (BEADLING et al., 2006).

O Interferon- γ (IFN- γ), que originalmente foi chamado de fator de ativação de macrófagos, quando estimula macrófagos induz mecanismos antitumorais e antimicrobianos e age também regulando positivamente o mecanismo de processamento da apresentação de antígenos (SCHRODER et al, 2004). É uma das citocinas mais importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas (YOUNG et al., 2017). Sob a condição de estresse ou infecção por patógeno pode aumentar a ativação de macrófagos, induzindo alto nível de citocinas pró-inflamatórias e baixo nível de citocinas anti-inflamatórias para promover a inflamação inata e resposta imune subsequente, enquanto aumenta a capacidade fagocítica do macrófago e potencial citolítico para eliminar o patógeno intracelular invasor (RAETZ et al., 2013). Este efeito do IFN- γ é comumente referido como atividade de *priming*, e a ativação de macrófagos assistida por IFN- γ é chamada de ativação clássica de macrófagos (MURRAY et al., 2011). Inicialmente, entendia-se que o INF- γ era uma citocina produzida por linfócitos T, no entanto existem evidências que seja secretada também por linfócitos B, NK e apresentadoras de antígenos profissionais (APCs; *Antigen Presenting Cells*) (FRUCHT et al., 2001). Em geral, a secreção por APCs e células NK

está relacionada com respostas iniciais contra infecções, enquanto que, a secreção por linfócitos T ocorre na resposta imune adaptativa (SCHRODER et al., 2004).

A IL-10 é uma importante citocina que atua para conter a inflamação, suprimindo diversas funções de células NK, linfócitos T e inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β , por macrófagos ativados e colaborando para manter a homeostase do tecido (ROSSOL et al., 2011). Sua secreção se sobrepõe à de IL-6 e TNF- α , embora a secreção de IL-10 tenha pico em um ponto um pouco mais tarde (STANLEY et al., 2012). IL-10 suprime a expressão de MHC-II em macrófagos ativados e é, portanto, um potente inibidor da apresentação de antígenos, além de diminuir a proliferação de linfócitos Th1 e induzir um perfil Th2 (TRINCHIERI, 2007).

A proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1 / CCL2) é um membro da família das quimiocinas C-C e um potente fator quimiotático para monócitos. O CCL2 é produzido por muitos tipos de células, incluindo células endoteliais, fibroblastos, monocíticas e microgliais (BARNA et al., 1994). Essas células são importantes para as respostas imunes antivirais na circulação periférica e nos tecidos. No entanto, monócitos / macrófagos são considerados a principal fonte de CCL2, regulando a migração e infiltração de monócitos, linfócitos T de memória e células NK (DESHMANE et al., 2009).

O fator de crescimento estimulador de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) é uma glicoproteína monomérica que funciona como uma citocina (CRUZ et al., 2014). O GM-CSF estimula as células-tronco a produzirem granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e monócitos. Quando amadurecem em macrófagos e células dendríticas, os monócitos saem da circulação e migram para o tecido causando uma alteração dos receptores expressos na superfície das células. Assim, faz parte da cascata imune / inflamatória, pela qual a ativação de um pequeno número de macrófagos pode levar rapidamente ao aumento de seu número, processo crucial para o combate à infecção. GM-CSF é produzido por diversos tipos celulares incluindo macrófagos, células de mastócitos, células T, fibroblastos e células endoteliais geralmente em resposta à ativação imunológica e citocinas mediadoras da inflamação: IL-1, IL-6 e TNF- α (GASSON, 1991).

1.5 Moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86

As moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) são moléculas co-estimuladoras melhor caracterizadas, sendo expressas predominantemente na superfície das APC (HATCOCK et al., 1994). Como proteínas transmembranares na superfície de APCs, CD80 e CD86 têm função em exibir tanto o reconhecimento dentro da resposta inata quanto a ativação da resposta adaptativa. CD80 e CD86 são membros da família das imunoglobulinas (IgSF), expressos por células hemopoiéticas, incluindo monócitos, macrófagos, DCs e células B (CARRENO et al., 2002).

CD80 é uma glicoproteína hidrofóbica de tipo I, de 55 kDa, e com um domínio citoplasmático curto de 19 aminoácidos. Por outro lado, CD86 é uma glicoproteína de membrana do tipo 1, de 70kDa, composta por um domínio citoplasmático estendido (GREENFIELD et al., 1998). Lim et al, demonstrou, em níveis basais, os macrófagos expressam baixos níveis de CD80 e expressam constitutivamente CD86, mas ambas as moléculas podem ser induzidas após estimulação de LPS ou IFN- γ (LIM et al., 2005).

Além das diferenças relacionadas à cinética de ligação de CD80 e CD86 aos seus receptores, um número relevante de estudos tem questionado a equivalência dos efeitos co-estimuladores gerados por estas duas moléculas com resultados contrastante frente ao papel funcional desempenhado por CD80 e CD86 na ativação de linfócitos T, sugerindo diferenças de natureza qualitativa e quantitativa entre as duas moléculas (FIELDS et al., 1998; BOYLAN et al., 1999; LANG et al., 2002; XIANG et al., 2008).

Dois sinais são necessários para a ativação de linfócito T. O primeiro é o antígeno-dependente e requer que a molécula de MHC apresente antígeno para o receptor de linfócitos T. A segunda é a ligação de CD80 ou CD86 no receptor CD28 na superfície dos linfócitos T (BUGEON et al., 2004). Após a interação CD80 / CD86-CD28, os linfócitos T são ativados, proliferam e se diferenciam para adquirir funções efectoras (ALEGRE et al., 2001). Eles também fornecem ajuda para outras células, como linfócitos B e células NK, para iniciar uma resposta imune adaptativa (ALEGRE et al., 2001). Os linfócitos T ativados produzem citocinas por meio da indução de genes de citocinas e estabilização do mRNA (LINDSTEIN et al., 1989).

Além de interagir com o CD28, as moléculas CD80 e CD86 (B7) também podem se ligar à proteína T-linfócito-associada citotóxica 4 (CTLA-4), também conhecido como CD152, iniciando um sinal inibitório, regulando negativamente a proliferação de linfócitos T (WANG et al., 2006). Esta ligação leva à inativação dos linfócitos T, interrompendo a resposta imune e ocorre com cerca de 20 vezes mais avidade do que a ligação de CD80 e CD86 (B7) à CD28 (LIM et al., 2002). CTLA-4 compartilha 30% de homologia com CD28, mas tem uma afinidade maior para seus ligantes, preferencialmente interagindo com CD80 / CD86 para encerrar uma resposta imune (ALEGRE et al., 2001). O CTLA-4 atua reduzindo a produção de IL-2 e a expressão do receptor de IL-2 e prendendo os linfócitos T na fase G1 do ciclo celular (KRUMEL et al., 1995).

1.6 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás extremamente instável, originado pela ação da iNOS (óxido nítrico-sintase induzível) sobre a L-arginina em macrófagos ativados. Por ser uma molécula altamente reativa, o NO interage com os microrganismos, alterando as propriedades de moléculas vitais para sua sobrevivência e favorecendo a sua eliminação. No entanto, a produção excessiva de NO pode levar à destruição de tecidos saudáveis do hospedeiro e ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (GREEN et al., 1990).

A enzima iNOS geralmente não é expressa em células, mas a sua expressão é positivamente regulada pelo IFN- γ , que age sinergicamente com o TNF- α e com o LPS bacteriano, e é inibida por citocinas como a IL-4 e IL-10 e o TGF- β (BOGDAN et al., 1994). IFN- γ regula a expressão do fator de transcrição IRF-1, que é essencial para a transcrição da iNOS (KAMIJO et al., 1994), enquanto que, citocinas como TNF- α - ou IL-1 e lipopolissacarídeo (LPS) regulam a translocação nuclear de NF- κ B, seguindo a degradação de seu inibidor, I κ B. Por ser altamente mutagênico e tóxico ao DNA e provocar alterações nas funções normais das células e na morte celular, as grandes quantidades de NO produzidas durante as respostas inflamatórias vêm sendo apontadas por vários autores como um dos agentes do processo de envelhecimento (McCANN et al., 1998).

O NO gerado pela ação da iNOS está principalmente relacionado com a defesa contra patógenos, constituindo-se no mediador crucial da via efetora de resposta de macrófagos em sítios inflamatórios (MACMICKING et al., 1997). Todavia, alguns trabalhos vêm mostrando que o NO também apresenta um importante papel na supressão da proliferação de células T (BRONTE et al., 2003), por inibir a sinalização intracelular do receptor da IL-2 (BINGISSER et al., 1998).

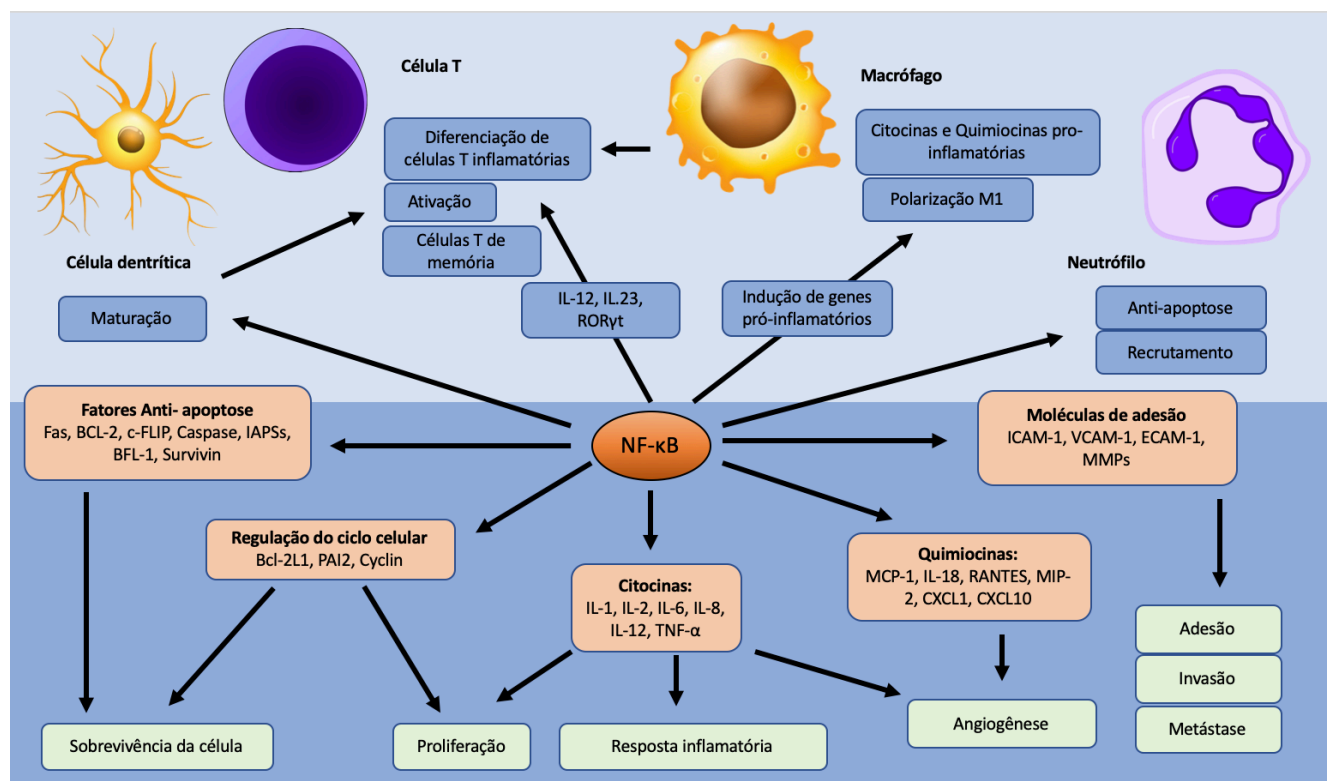
1.7 NF- κ B

O fator nuclear- κ B (NF- κ B) foi descrito por Sen e Baltimore em 1986 como uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B. Atualmente, sabe-se que este fator também regula a expressão de diversos genes ligados à resposta imune e inflamatória, genes envolvidos na apoptose, quimiocinas, desenvolvimento e na ativação de vários promotores virais (SKALNIK, 2002). O NF- κ B representa uma família de fatores de transcrição induzíveis, que regula uma grande variedade de genes envolvidos em diferentes processos das respostas imunológicas e inflamatórias, mediando a indução de vários genes pró-inflamatórios em células imunes inatas e regulando a ativação, diferenciação e função dos linfócitos T inflamatórios (OECKINGHAUS et al., 2009) (**Figura 5**). Esta família é composta por cinco membros estruturalmente relacionados, incluindo NF- κ B1 (também denominado p50), NF- κ B2 (também denominado p52), RelA (também denominado p65), RelB e c-Rel, que medeia a transcrição de genes alvo por ligação a um elemento de DNA específico, potenciador κ B, como vários hétero ou homodímeros (SUN et al., 2013). As proteínas NF- κ B são normalmente sequestradas no citoplasma por uma família de proteínas inibitórias, incluindo membros da família I κ B e proteínas relacionadas caracterizadas pela presença de repetições de anquirina (proteína do citoesqueleto) (SUN et al., 2011).

A ativação de NF- κ B possui duas vias principais de sinalização, as vias canônicas e não canônicas (ou alternativas), ambas sendo importantes para regular as respostas imunes e inflamatórias, apesar de suas diferenças no mecanismo de sinalização (VALLABHAPURAPU et al., 2009). A via canônica do NF- κ B responde a diversos estímulos, incluindo ligantes de vários receptores de citocinas, reconhecimento de padrões receptores (PRRs), membros da superfamília do receptor de TNF (TNFR), bem como receptor de linfócitos T (TCR) e receptor de linfócitos B.

O principal mecanismo para a ativação canônica de NF- κ B é a degradação induzível de I κ B α , desencadeada por meio de sua fosforilação por um complexo de quinase I κ B (IKK) de múltiplas subunidades. A proteína 1,7 IKK é composta de duas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , e uma subunidade reguladora chamada modulador essencial NF- κ B (NEMO) ou IKK γ (SUN et al., 2008). A IKK pode ser ativada por diferentes estímulos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, mitógenos, componentes de microrganismos e agentes de estresse. Após a ativação, IKK fosforila I κ B α em duas serinas N-terminal e, assim, desencadeia a degradação de I κ B α dependente de ubiquitina no proteassoma, resultando em translocação nuclear rápida e transitória de membros NF- κ B canônicos, os dímeros p50 / RelA e p50 / c-Rel (HAYDEN et al., 2008).

Figura 5. Genes alvo de NF- κ B envolvidos no desenvolvimento e progressão da inflamação.



Fonte: Adaptado de LIU et al., 2017.

Em contrapartida, a via alternativa de NF- κ B responde seletivamente a um grupo específico de estímulos, incluindo ligantes de um subconjunto de membros da superfamília TNFR, como LT β R, BAFFR, CD40 e RANK (SUN et al., 2011). Além disso, a ativação alternativa não envolve a degradação de I κ B α , mas depende do processamento da proteína precursora de NF- κ B2, a p100. Uma molécula de

sinalização central para esta via é a quinase indutora de NF- κ B (NIK), que ativa e coopera funcionalmente com IKK α para mediar a fosforilação, induzir a ubiquitinação e processamento de p100 (SENFTLEBEN et al., 2001). O processamento de p100 envolve a degradação de uma estrutura semelhante à sua, denominada I κ B C-terminal, resultando na geração de NF- κ B2 p52 maduro e na translocação nuclear do complexo NF- κ B não canônico p52 / RelB (ZHANG et al., 2015). Funcionalmente, o NF- κ B canônico está envolvido em quase todos os aspectos do sistema imunológico, enquanto a via NF- κ B não canônica parece estar evoluindo como um eixo de sinalização suplementar que coopera com a via NF- κ B canônica na regulação de funções específicas do sistema imune adaptativo (SUN et al., 2011).

2. Justificativa

O conhecimento aprofundado da resposta dos macrófagos estimulados pelo alérgeno Antígeno 5, representado aqui por Poly p 5, presente no veneno da vespa social *P. paulista*, pode ampliar o potencial terapêutico para pacientes com hipersensibilidade ao veneno deste inseto. O padrão de secreção de citocinas dessas células *in vitro* permite avaliar o potencial pró-inflamatório ou anti-inflamatório desse estímulo.

Desta forma, o presente projeto buscou avaliar se a proteína Ag5 atua como um modulador da resposta imunológica, alterando o perfil secretor de citocinas de macrófagos *in vitro*. Para isto, neste trabalho, a proteína rPoly p 5 foi utilizada como modelo de estudo. Essa proteína é correspondente ao alérgeno nativo Poly p 5 (nPoly p 5) do veneno de *P. paulista*, expresso na forma recombinante na levedura *Komagataella phaffii*. Até o momento, este alérgeno recombinante apresentou propriedades imunológicas similares ao nPoly p 5, o qual é extremamente difícil de ser obtido devido as suas ínfimas quantidades no veneno *in natura*.

3. Objetivo

Avaliar os efeitos da proteína rPoly p 5, correspondente ao alérgeno Poly p 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae), expresso na forma recombinante na levedura *Komagataella phaffii*, sobre culturas primárias de macrófagos extraídos de camundongos. Foram avaliados fatores moduladores do sistema imune, como liberação de mediadores e de citocinas relacionadas com a resposta inflamatória.

3.1. Objetivos específicos

Avaliar, em culturas primárias de macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com a proteína rPoly p 5, os seguintes aspectos:

- Alterações de viabilidade em culturas primárias de macrófagos obtidos de peritônio
- Níveis de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de culturas de macrófagos obtidos de peritônio
- Perfil de marcadores de superfície de macrófagos estimulados, por meio de citometria de fluxo.
- Níveis de citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-1 α , IL-12p70, IFN- γ , IFN- β , IL-27, IL-17a, IL-23, IL-10, GM-CSF e MCP-1 nos sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais de camundongos estimulados.
- Expressão da forma fosforilada de NF- κ B em culturas primárias de macrófagos de camundongos.

4. Material e Métodos

4.1. Macrófagos

Os camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com 4 a 6 semanas de idades. Os camundongos foram mantidos em condições SPF (livres de patógenos comuns), com controle de luz, temperatura e umidade em racks ventiladas (Alesco, Monte Mor –SP) localizadas no Biotério Experimental do Laboratório de Imunologia Translacional (LIT). Os procedimentos envolvendo animais e seus cuidados foram conduzidos de acordo com as diretrizes e recomendações estabelecidas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e os protocolos experimentais foram avaliados e aprovados pelo do Comitê de Ética e Experimentação Animal Institucional (CEUA-UNICAMP). Os macrófagos murinos estimulados foram colhidos das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c, que haviam recebido injeção intraperitoneal de 3 mL de tioglicolato de sódio de 3%, 4 dias antes dos ensaios. As células foram transferidas para tubos cônicos, de polipropileno, estéreis, mantidos em gelo e submetidos à centrifugação a 200 x g, durante 10 min a 5°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em meio de cultura (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; meio completo). As células foram contadas em hemocítômetro e a suspensão ajustada a 1×10^6 células/mL para cultivo (JUSTO et al., 2015).

4.2. Reagentes

O lipopolissacarídeo (LPS, *Escherichia coli*, O111: B4), 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), RPMI, meio Eagle modificação de Dulbecco (DMEM) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O soro fetal de bovino foi adquirido da Cultilab (Campinas, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.3. Eletroforese de Proteínas

Para análise das proteínas 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 proteicos), 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).

4.4. Obtenção do rPoly p 5

4.4.1. Desenho dos *primers* e amplificação de Poly p 5

Com a sequência de cDNA do alérgeno Poly p 5 clonada em vetor pUC57 (miniprep) (BAZON et al., 2017), foram desenhados novos *primers* a fim de dar continuidade a uma nova estratégia de clonagem. A estratégia segue resumida abaixo, a qual foi realizada no Laboratório de Biotecnologia de Leveduras, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), sob a coordenação do professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres.

Para o desenho dos *primers*, listados abaixo na Tabela 1, foi utilizada a sequência de nucleotídeos e aminoácidos de Poly p 5, já depositada no GenBank (KU558986.1) por nosso grupo de pesquisa. Foram adicionados também os sítios de restrição das enzimas Xho I e Sal I, que foram extremamente importantes para que ocorresse a clonagem de forma unidirecional e *in frame* no vetor pPICZαA.

Tabela 1. Sequência de *primers* para expressão do alérgeno Poly p 5. As regiões escritas em negrito e sublinhadas são referentes aos sítios de restrição das enzimas utilizadas.

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Sítio da enzima de restrição	Tamanho
Poly p 5_F	5' AGGGGTATCT <u>CTCGAGA</u> AATAAGTACTGTAATATCAAATGC 3'	<i>Xho</i> I	40 pb
Poly p 5_R	5' GATGATGATG <u>GTCGAC</u> CTTCTTTGTGTAGATAGGTTG 3'	<i>Sal</i> I	37 pb

As reações de amplificação foram realizadas com a mistura “PCR Master Mix” (Qiagen®) seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante: 12,5µL de “PCR Master Mix” (concentração final na reação: 0,625U de Taq DNA polimerase, 200µM de cada nucleotídeo e 1,5mM de MgCl₂); 0,2-0,4µM de cada um dos iniciadores; 1µL de cDNA (800-1000ng), água Milli-Q para o volume final de 25µL. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições:

PRÉ-PCR		
Denaturação	95°C	5 min.
PCR: 35 ciclos		
Denaturação	95°C	1 min.
Anelamento	54°C	3 min.
Extensão	72°C	3 min.
EXTENSÃO FINAL		
	72°C	15 min.
4°C ∞		

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1 % em TAE 1X, e as amostras visualizadas com a adição de Blue green 1:5 (v/v; Blue Green:amostra). As corridas eletroforéticas foram realizadas sob tensão elétrica de 70 volts, por 30 minutos.

4.4.2. Digestão pPICZ α -A e clonagem *in-fusion* do cDNA de Poly p 5

O vetor pPICZ α -A foi duplamente digerido com as enzimas de restrição, *Sal*I e *Xho*I (New England BioLabs), seguindo a orientação do fabricante. A digestão foi analisada em gel de agarose 1 % em TAE 1X, e as amostras visualizadas com a adição de Blue green 1:5 (v:v) (Blue Green:amostra). O fragmento de pPICZ α -A digerido foi cortado do gel, fundido por 5 minutos a 60°C e purificado utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo orientações do fabricante.

Após a digestão, o vetor pPICZ α -A digerido e o produto de PCR de *poly* p 5 foram ligados utilizando o kit In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit (Takara Bio), segundo o protocolo de reação sugerido pelo fabricante. Para as reações foram utilizados 2 μ L de pPICZ α -A, 1 μ L de *poly* p 5 (PCR) e 7 μ L H₂O. As amostras foram incubadas a 37° por 15 minutos, 50°C por 15 minutos e deixadas em gelo até o momento da transformação.

O pPICZ α -A contendo *poly* p 5 foi utilizado para as transformações em *E.coli* DH5 α , quimicamente competentes. Resumidamente, 10 μ L de pPICZ α -A + *poly* p 5 foram incubados com 80 μ L de células competentes DH5 α por 30 minutos no gelo, antes do choque térmico das amostras, de 90 segundos a 42°C seguido de gelo novamente. A cada reação foram adicionados 900 μ L do meio SOC (solução autoclavada de 0.02g/L de triptona, 0.005 g/L de extrato de levedura e 0.0005g/L de NaCl, adicionada de 0,01M de MgCl₂, 0,01M de MgSO₄ e 0,04% de glicose estéreis) à temperatura ambiente, os tubos tipo eppendorf foram colocados na horizontal em incubadora por 1 hora a 37°C, com agitação de 220rpm, e a seguir, diferentes volumes destas suspensões de bactérias transformadas foram aplicados em placas de *Petri*. O plaqueamento das bactérias foi realizado com volumes de 100 μ L a 200 μ L das transformações, em meio Luria-Bertani agar (Tryptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0% pH 7,0), contendo zeocina a 100 μ g/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por no mínimo 18 horas antes das análises.

O vetor pPICZ α A foi selecionado para clonagem por conter o peptídeo sinal α -factor de *Sacharomices*, mais a cauda de histidina no C-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.

4.4.3. Extração (“mid-prep”) do DNA plasmidial (pPICZ α -A+poly p 5)

Uma colônia isolada foi utilizada para realização da extração do DNA plasmidial. As culturas foram crescidas em 100mL de meio líquido LB Low Salt contendo 100 μ g/mL de zeocina, a uma agitação de 220rpm, 37°C, durante 18 horas. As extrações de DNA plasmidial foram feitas com o kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega). Ao final do processo, o material foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TAE 1X e visualizados no gel pela coloração da amostra com Blue green.

4.4.4. Clonagem da construção pPICZ α -A+poly p 5 em *Komagataella phaffii*

Para transformar o vetor contendo o inserto de interesse na cepa X-33 de *K. Phaffii* foi necessário linearizar o vetor através de uma digestão com a enzima Sac I. Foram utilizados 10 μ g/ μ L do vetor pPICZ α -A+poly p 5, 5 μ L NEBuffer™ 1.1 (10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 μ g/ml BSA), 3 μ L da enzima de restrição Sac I e 12 μ L H₂O Milli-Q.

Os clones recombinantes foram utilizados para transformação em cepa X33 de *K. Phaffii* (X-33/pPICZ α A-poly p 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).

Resumidamente, uma colônia isolada da cepa X-33 foi crescida em 100 mL YPD em Erlenmeyer de 1000 mL por 24 horas até atingir a OD₆₀₀ entre 1,3 e 1,5. As células foram centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 mL de H₂O Milli-Q autoclavada e centrifugada novamente nas mesmas condições. A etapa de lavagem se repetiu por duas vezes. Em seguida as células foram ressuspensas em 4 mL de Sorbitol 1M refrigerado. Centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 300 μ L de Sorbitol 1 M.

Foram misturadas 80 μ L de células competentes X-33 com 10 μ g de DNA linearizado (pPICZ α A+poly p 5), adicionado 320 μ L de Sorbitol 1M gelado e transferido para uma cubeta de eletroporação.

A eletroporação ocorreu no aparelho XCELL™ (BioRad) nas seguintes condições: 1500V, 400 Ω , 25 μ F. Tempo de eletroporação: ~10 ms com campo de 7500 V/cm. Imediatamente após a eletroporação foi adicionado 1 mL de Sorbitol e incubado por 2 horas à 30°C. As células transformadas foram plaqueadas em meio YPD (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, dextrose (glicose) a 2% e ágar a 2%) contendo zeocina a 100 μ g/mL. Colônias isoladas foram utilizadas para realizar a expressão da nova construção de pPICZ α A-poly p 5.

4.4.5. Expressão do rPoly p 5 em *Komagataella phaffii*

Para a expressão da proteína, as células de *Komagataella phaffii* X-33/pPICZ α A contendo o Ag 5 de *P. paulista* foram crescidas em meio YPD-agar Yeast Extract Peptone Dextrose – (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, dextrose (glicose) a 2%, ágar a 2% e zeocina a 100 μ g/mL), a 28 °C, *overnight*. Uma colônia de levedura isolada da placa foi selecionada para preparação do pré-inóculo, o qual foi crescido durante a noite (17 a 20 horas, a 28°C com agitação de 250 rpm), em 25mL do meio BMGY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, 100 mM do tampão KPO₄ pH 6,0, YNB a 1.34%, biotina a 4x10⁻⁵% e glicerol a 1%) em frasco Erlenmeyer de 250 mL tampados com apenas 3 camadas de gaze, pois a levedura requer muito oxigênio para crescer.

Após 17 a 20 horas do início do crescimento do pré-inóculo, as células foram submetidas à leitura em espectrofotômetro. Ao atingirem DO_{600nm} entre 4 a 6, foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas 3 vezes com 25 mL de H₂O estéril. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 100 mL do meio BMMY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, tampão KPO₄ pH 6,0 a 100 mM, YNB a 1.34%, biotina a 4x10⁻⁵%, metanol a 1%) 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 horas” (T₀) foi retirada, e ao restante da suspensão adicionado o indutor – metanol- a uma concentração final de 1%, a cada 24h, durante 5 dias (T₇₂ h), 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 *K. phaffii* transformado com o vetor pPICZ α A

vazio. No tempo de 72 horas após a indução, as culturas foram transferidas para tubos Falcon de 50mL, submetidas ao processo de centrifugação a 3000 x g, 10 minutos à temperatura ambiente, tendo seus sobrenadantes recolhidos para análise da expressão em SDS-PAGE 12% e purificação da proteína expressa.

4.4.6. Purificação de rPoly p 5

Primeiramente, o sobrenadante contendo rPoly p 5 (T_{72}) passou por uma etapa sequencial de filtrações em membranas (Standard MF-Millipore Membranes) de 0.45 μm e 0.22 μm , respectivamente, para a retirada dos resíduos celulares. A seguir, a amostra foi concentrada utilizando filtros Amicon (Ultra-15 Centrifugal Filter Units) de 10 kDa e ressuspensa em 10 mL do tampão Na/PO_4 (0,02 M) pH7,4, contendo, NaCl 0,5 M. A purificação do rPoly p 5 expresso foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} (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_4 , 300 mM de NaCl e 20 mM de Imidazol); (ii) Tampão de eluição da coluna (50 mM Na/PO_4 , 300 mM NaCl, 75 mM de Imidazol). O único parâmetro de diferenciação destes tampões consiste na concentração final de imidazol, desde a calibração da resina até a eluição da proteína. Após a purificação da proteína expressa com “His-tag”, realizou-se uma análise das frações eluídas desta coluna, por SDS-PAGE 12%.

4.5. Análise de glicosilação rPoly p 5

A amostra rPoly p 5 purificada passou por dois procedimentos para verificar sua possível glicosilação. Primeiramente foi realizado uma eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. Logo após o gel foi mergulhado em álcool isopropílico ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) 25 % e 10 % ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) por 16 horas à temperatura ambiente. No dia seguinte, foi submetido a uma lavagem em 7,5% de ácido acético por 30 minutos, colocado em 0,2% ácido periódico a 4°C por uma hora e imediatamente imerso em reagente de Schiff's por mais uma hora. O descolorimento foi realizado com diversas mudanças em 7,5% de ácido acético em temperatura ambiente.

A remoção da glicosilação foi realizada com a enzima PNGase – F (New England Biolabs). Cerca de 20 ng do rPoly p 5 foi utilizado para fazer a reação de deglicosilação, seguindo o protocolo do fabricante (MAGNELLI et al, 2011).

4.6. Sequenciamento da proteína rPoly p 5

4.6.1. Análise proteômica com a estratégia do tipo *Shotgun*

A análise proteômica foi realizada no Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, UNESP – Rio Claro - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob a supervisão do Dr. José Roberto dos Santos Pinto. Para a realizar a digestão em solução (*shotgun*), a amostra de rPoly p 5 purificada (400 µg) foi solubilizada em bicarbonato de amônio 50mM, pH 7.9 contendo ureia 7.5 M, e incubada por 60 min a 25°C sob leves agitações periódicas. Em seguida foi realizado o tratamento de redução e alquilação com a adição de DTT 10mM por 60 min a 37°C; e iodoacetamida 40mM, também por 60 min a 25°C. Após esse tratamento a amostra foi diluída cinco vezes com bicarbonato de amônio 100 mM, pH 7.8, contendo cloreto de cálcio 1M. Foram utilizadas as enzimas tripsina (Promega) 40 ng/µL a 37°C por 16h; e quimiotripsina (Promega) 40 ng/µL a 30°C por 16h. A reação de digestão foi interrompida com 5 µL de ácido fórmico (AF). A amostra digerida foi dessalinizada utilizando uma coluna SPE C18 (Discovery DSC-18, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA) condicionada com ACN/TFA 0.1%. Os peptídeos foram eluídos da coluna com ACN 80%/ TFA 0.1%, secos em Speedvac e solubilizados em ACN 50%/AF 5% para serem analisados.

4.6.2. Análises de espectrometria de massas

Para as análises de espectrometria de massas foi utilizado um espectrômetro do tipo µLC-ESI-micrOTOF-Q-III (Bruker Daltonics Bremen, Alemanha), acoplado a um sistema UFLC (Shimadzu) contendo duas bombas LC-20AD e um amostrador automático SIL-20AHT. Foi utilizado um gradiente de 5 a 95% (v/v) ACN, contendo 0.05% (v/v) de ácido fórmico por 120 min, em uma coluna C-18, 12 nm (3 mm id x 100 mm, 2.2 µm) (Shim-pack XR-ODS, Shimadzu). O software HyStar v3.2 (Bruker Daltonics) foi utilizado para o controle de aquisição e análise dos dados, com a eluição dos peptídeos sendo monitorada à 214 nm em um fluxo de 0,2 mL/min. Os dados de

MS e MS/MS foram adquiridos em uma faixa de m/z 100 a m/z 3000, em um espectrômetro de massas equipado com uma fonte de ionização “electrospray” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas quadrupolo e Time-of-Flight (Q-ToF) (Bruker Daltonics). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, utilizando o princípio de dissociação de íons CID (dissociação induzida por colisão) e o hélio como gás de colisão, a uma pressão de 100kPa, energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz. Os espectros de massas foram adquiridos e uma lista de picos foi gerada utilizando o software Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics). Antes das análises, o espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução calibrante Tune-Mix Electrospray Calibrant (Agilent).

4.6.3. Identificação da proteína

Para a identificação da proteína foi utilizado o servidor MASCOT 2.3.02 (Matrix Science, London, UK) realizando buscas contra o banco de dados de Hymenoptera. Os parâmetros de busca foram utilizados de acordo com a taxonomia do organismo de estudo (Metazoa / Other Metazoa), assim como também, conforme dados oriundos durante a manipulação experimental das amostras, como o tipo de enzima proteolítica utilizada e possíveis modificações fixas e variáveis que possam ocorrer. Dessa forma foram utilizados os seguintes parâmetros: (a) Enzima: Tripsina / Quimiotripsina; (b) Carbamidometilação (C) como modificação fixa; (c) Oxidação (M), como modificação variável; (d) N° de clivagens perdidas pela enzima: 2; (e) Massa molecular do tipo: Monoisotópica; (f) Massa molecular: sem restrições; (g) Erro de tolerância de peptídeos ± 0.5 Da e erro de tolerância de $MS_n \pm 0.8$ Da; (h) Protonação: +1, +2, +3 para o estado de carga dos peptídeos; (i) Tipo de instrumento: ESQUAD-TOF; (j) Foram admitidos Protein Scores significativos ($p < 0.05$) para a identificação das proteínas.

As proteínas identificadas foram submetidas à análise pelo algoritmo Scaffold 4.3.2 (Proteome Software Inc., Portland, OR), para validar a identificação dos peptídeos e cálculo do FDR - false discovery rate (menos que 1%). FDR foi calculado considerando pelo menos duas sequências peptídicas distintas. De acordo com o FDR algoritmo implementado no Scaffold, a probabilidade de identificação dos peptídeos foi ajustada para um mínimo de 99%, enquanto que a probabilidade de identificação das proteínas foi de 95%.

4.7. Enteroquinase

A remoção do peptídeo sinal (α -factor) da amostra de rPoly p 5 se deu através da utilização da enzima Enteroquinase recombinante (GenScript). A enteroquinase foi diluída em concentrações de 0,01 IU/ μ L, 0,1 IU/ μ L e 1 IU/ μ L com tampão contendo 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 200mM NaCl, 2mM CaCl_2 , 50% glicerol e incubada com o rPoly p 5 a 22 °C em diferentes tempos : 1, 3, 5 e 16 horas, seguindo o protocolo do fabricante. Após a incubação, a amostra foi submetida a uma análise por SDS-PAGE 12%.

4.8. Cultura de macrófagos

Os macrófagos peritoneais murinos foram semeados em densidade de 2×10^5 células / poço, em placas de 96 poços, em um volume de 200 μ L/ poço e em placas de 12 poços contendo 1×10^6 células/poço, ambas cultivadas durante 2 horas. Os detritos foram removidos por lavagem com RPMI sem SFB. Em seguida, 200 μ L de meio RPMI, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Brasil), inativado por calor, foram adicionados por cavidade em placas de 96 poços e 1 mL por cavidade em placas de 12 poços. As culturas foram estimuladas com LPS (1 μ g/mL; Sigma), e/ou rPoly p 5 na concentração de 1 μ g/mL. As culturas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e 90% de umidade (ROBBE et al., 2015). Após a incubação, alíquotas dessas células em cultura foram coletadas para avaliação de seus marcadores de superfície por citometria de fluxo. As culturas em placas foram utilizadas ainda para ensaio de detecção de NO, citocinas e análise de NF-kB (FERNANDES, 2010; SIMIONI et al., 2004).

4.9. Avaliação da viabilidade celular em células de linhagem macrofágica J774 e RAW 264.7

As linhagens de células J774 e RAW 264.7 foram cedidas pela Prof. Dra. Wirla Tamashiro (IB-UNICAMP), e utilizadas para avaliar a viabilidade celular frente ao alérgeno rPoly p 5. As células foram cultivadas em meio DMEM (Vitrocell, Campinas-SP, Brasil) suplementado com soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, Campinas-SP, Brasil)

a 10%, a 37°C em 5% de CO₂. As células foram cultivadas até semi-confluência, em incubadora umidificada a 5% de CO₂, a 37°C. Em seguida, estas células foram colhidas, lavadas com o mesmo meio sem SFB, e a sua concentração ajustada a 2x10⁶ células / mL com meio completo. A suspensão de células de linhagem J774 e RAW 264.7 foram semeadas a uma densidade de 1x10⁶ células / poço em placas de 12 poços num volume de 500 µL /poço. Em seguida, foram acrescidos 500 µL de meio DMEM / poço, contendo 10% de SFB. As células foram tratadas com as concentrações de: 0,1µg/mL; 0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1µg/mL, 2µg/mL e 4 µg/mL de rPoly p 5. A avaliação da viabilidade e dos mecanismos de morte celular foram realizadas por meio da marcação das células utilizando o kit Fitc Annexin V Apoptosis Detection Kit, with 7-Aminoactinomycin D (7AAD) (Biolegend, San Diego, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo, Guava EasyCyte (Millipore) e as análises foram feitas com o InCyte (Millipore). Os resultados foram expressos como a porcentagem das células viáveis (duplo negativas), em fase inicial de apoptose (AnnexinV+/7AAD-) e em fase de apoptose tardia/necrose (AnnexinV+/7AAD+).

4.10. Quantificação da concentração de nitrito nos sobrenadantes da cultura

O óxido nítrico (NO) liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinado por ensaio colorimétrico quantitativo com base na reação de Griess (GREEN et al., 1982). Alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de células foram incubadas com 50 µL de reagente de Griess, que consiste de 1% de sulfanilamida; 0,1% de N- (1-naftiletilenodiamina) e dicloridrato de ácido orto-fosfórico a 2,5%. Após 10 minutos a temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida em um leitor de microplacas Multiskan MS (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia), no comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas por comparação com uma curva de calibração obtida com soluções padrão de nitrito de sódio.

4.11. Avaliação dos marcadores celulares CD80, CD86 e MHCII

Para avaliar o perfil de ativação dos macrófagos intraperitoneais, foi analisada a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 na população de células

F480⁺ e MHCII⁺. Para isto foi realizada a marcação das células utilizando anticorpos específicos conjugados à fluorocromos para os marcadores de superfície *anti-mouse* F480 Percp-Cy5.5 (fluorocromo composto de proteína clorofila peridina) e *anti-mouse* MHCII⁺ APC (Biolegend) para a marcação da população de macrófagos e anticorpos anti-mouse CD80 PE (fluorocromo ficoeritrina), anti-mouse CD86 Alexa-488 (Biolegend) para uso em citometria de fluxo, seguindo as recomendações dos fabricantes.

Em todas as amostras, houve a marcação com a sonda de viabilidade Zombie NIR™ Fixable viability kit (Biolegend), permitindo que todas as análises realizadas fossem feitas apenas em células viáveis. A determinação das populações positivas foi estabelecida tomando como base a fluorescência obtida nas amostras marcadas com os respectivos anticorpos controles de isotipos para os marcadores analisados. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSVerse™ (BD-Bioscience) localizado no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher CAISM –UNICAMP e as análises foram feitas com o software FCS Express V6 (De Novo Software, Glendale, CA, EUA). A expressão dos marcadores de Macrófagos peritoneais, foi avaliada pela média geométrica da intensidade de fluorescência dos respectivos marcadores.

4.12. Quantificação de citocinas nos sobrenadantes das culturas.

Sobrenadantes das culturas celulares foram utilizados para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, CCL2(MCP-1), IFN- β , IFN- γ , TNF- α , e GM-CSF; através de sistema de quantificação multiplex por citometria de fluxo. Para isto, foi utilizado o kit LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) (Biolegend), seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo, fluxo FACSVerse™ (BD-Bioscience) localizado no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher CAISM –UNICAMP e as análises foram feitas com o software LEGENDplex™ Data Analysis Software V.8 (Biolegend).

4.13. Avaliação forma fosforilada p65 de NF- κ B

Para a análise da presença de p65 (indiretamente NF- κ B) as células foram cultivadas na presença ou ausência de LPS/rPoly p 5, ambas na concentração de

1 µg/mL, em placa de 96 poços. As culturas de macrófagos intraperitoneais (1×10^6 células/mL) foram incubadas a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂ e 90% de umidade por 48 horas. Transcorrido o tempo, os sobrenadantes das culturas foram removidos e a marcação de NF-κB foi realizada nas células aderentes conforme o kit InstantOne ELISA™ 96 Well (ELISA05673-1, Invitrogen). A densidade óptica foi medida num leitor de microplacas (SpectraMax, Molecular Devices, CA, USA) a 540 nm.

4.14. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média, e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste de múltiplas comparações com análise Post Hoc Mann-Whitney entre os grupos, considerando nível de significância $p < 0,05$. Para estas análises, foi empregado o programa computacional GraphPad Prism Versão 6.0 (La Jolla, CA, USA).

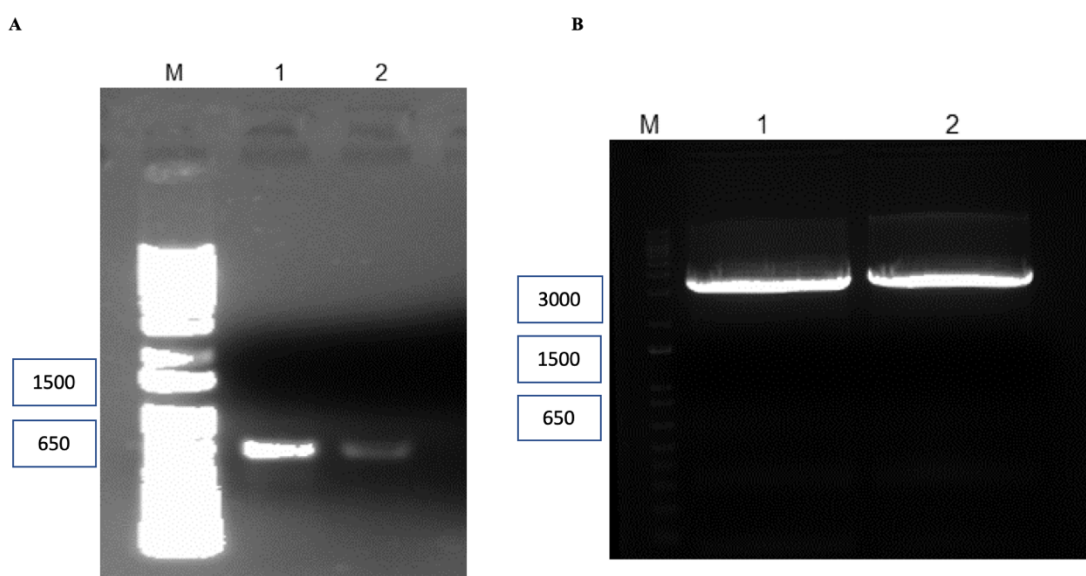
5. RESULTADOS

5.1. Clonagem, expressão e purificação de rPoly p 5 em *K. phaffii*

5.1.1. Amplificação de *poly* p 5 (pUC57), digestão do vetor pPICZ α -A e clonagem *in-fusion*

Para estes experimentos foram utilizados os *primers* Poly p 5_F e Poly p 5_R, com as enzimas de restrição Xho I e Sal I, respectivamente. 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). Desta forma, na Figura 6A, página 50, pode se observar que houve excelente nível de amplificação de uma única banda com as duas enzimas utilizadas na temperatura de 54°C. O vetor pPICZ α -A vazio foi digerido com as mesmas enzimas Xho I e Sal I a fim de realizar a clonagem *in-fusion* com o fragmento de PCR amplificado do cDNA de Poly p 5, como mostrado na **Figura 6B**.

Figura 6. Amplificação do cDNA de Poly p 5 e Digestão vetor pPICZ α -A. **(A)** Representação gráfica do perfil eletroforético da banda de cDNA de Poly p 5 obtida por PCR gene-específico. A canaleta M refere-se ao padrão de DNA ladder de 1kb (Thermo Fisher - cod. 10787018), (1 e 2) – cDNA do Poly p 5 do veneno de *P. paulsita*. **(B)** Representação gráfica da análise de restrição do vetor pPICZ α -A com Xho I e S al I, por meio do perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em TBE 1x. A canaleta M refere-se ao padrão de DNA ladder de 1kb (Thermo Fisher - cod. 10787018). (1 e 2) – pPICZ α -A. Digerido com Xho I e Sal I. Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green (4 μ L/ 6 μ L de amostra) em gel de agarose a 1% em TBE 1x.

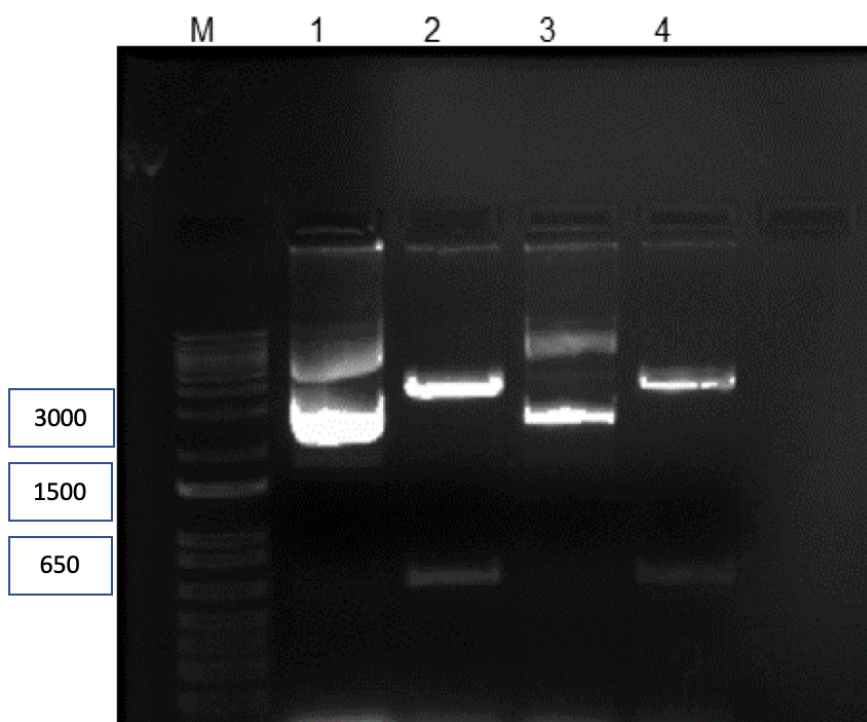


Após a digestão, a banda correspondente ao vetor pPICZ α -A foi cortada do gel e purificada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). A ligação entre o produto de PCR (*poly* p 5) e o vetor digerido foi realizada utilizando a técnica *in-fusion* com o kit In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit (Takara). A técnica de *in-fusion* é projetada para clonagem direcional rápida e conveniente de um ou mais fragmentos de DNA (por exemplo, insertos gerados por PCR) em qualquer vetor. Logo em seguida o pPICZ α -A contendo o cDNA de Poly p 5 foi transformado em *E.coli* DH5 α e plaqueado conforme descrito no item 4.4.2.

5.1.2. Extração do DNA plasmidial e clonagem da construção pPICZ α -A+*poly* p 5 em *K. phaffii*

O DNA plasmidial foi extraído conforme descrito em Material e Métodos. Para confirmar se o vetor pPICZ α -A continha o inserto de *poly* p 5 foi realizado uma digestão com as enzimas *Xho* I e *Sal* I, sendo o resultado mostrado na **Figura 7**.

Figura 7. Digestão vetor recombinante pPICZ α -A + *poly* p 5. Representação gráfica da análise de digestão do vetor pPICZ α -A + *poly* p 5 com *Xho* I e *Sal* I. A canaleta M refere-se ao padrão de DNA *ladder* de 1kb (Thermo Fisher - cod. 10787018). (1 e 3) – midprep pPICZ α -A + *poly* p 5. (2 e 4) pPICZ α -A + *poly* p 5 digerido com *Xho* I e *Sal* I. Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green (4 μ L/ 6 μ L de amostra) em gel de agarose a 1% em TBE 1x.



Conforme podemos analisar na imagem acima, a ligação do vetor com o inserto foi realizada de forma bastante efetiva, podendo ser observada uma banda de aproximadamente 621 pb, tamanho esperado para o DNA de Poly p 5 do veneno de *P.paulista*.

Após a ligação *in-fusion*, o vetor pPICZα-A + *poly* p 5 foi linearizado com a enzima *Sac* I para posteriormente ser transformado com a cepa X-33 de *K. phaffii*. O procedimento foi realizado conforme descrito no item 6.7.3. A transformação do vetor linearizado com a cepa X-33 de *K. phaffii* ocorreu por eletroporação e de forma bastante eficiente (**Figura 8A**). Para identificar as colônias positivas (que continham o inserto *poly* p 5) foram realizados PCR de colônias com os primers Poly p 5_F e Poly p 5_R (**Figura 8B e Figura 9**).

Figura 8 . Construção X-33/pPICZαA-*poly* p 5 em YPD-ágar. (A) Placas contendo colônias de X-33/pPICZαA-*poly* p 5 em meio YPD. (B) Placas contendo colônias isoladas de X-33/pPICZαA-*poly* p 5 para realização de PCR de colônia.

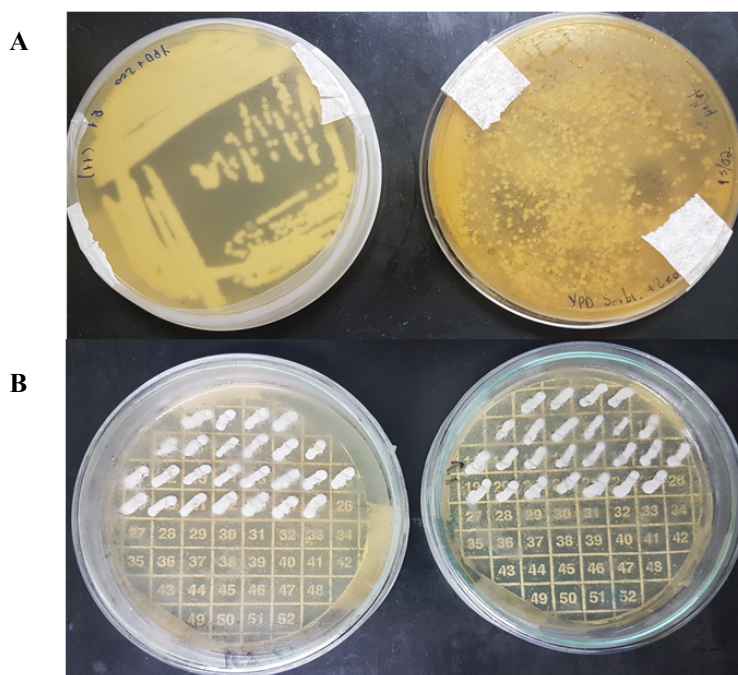
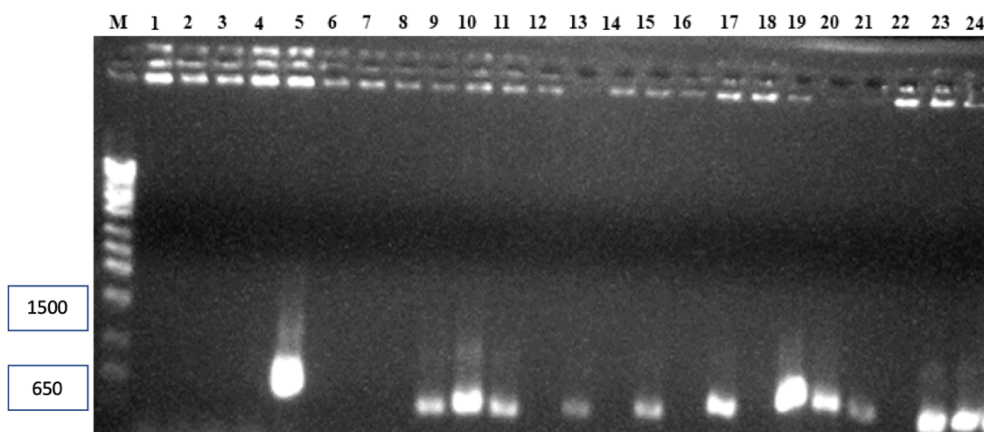


Figura 9. Representação gráfica do perfil eletroforético *poly* p 5 obtida por PCR de colônia gene-específico com os *primers* Poly p 5_F e Poly p 5_R. A canaleta M refere-se ao padrão de DNA *ladder* de 1kb (Thermo Fisher - cod. 10787018). (1 a 24) – PCR de colônias isoladas de X-33/pPICZαA-*poly* p 5. Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green (4μL/ 6 μL de amostra) em gel de agarose a 1% em TBE 1x.



O PCR de colônia foi realizado conforme descrito anteriormente no item **4.4.1** de Material e Métodos, sendo que a única diferença foi a utilização de uma colônia isolada da construção X-33/pPICZαA-*poly* p 5 (**Figuras 8 A, B**) como *template*. Como é possível observar na **Figura 9** acima, algumas colônias foram positivas, apresentando uma banda de aproximadamente 621 pb, correspondente ao cDNA do alérgeno Antígeno 5 de *P. paulista* e essas colônias foram utilizadas para a expressão do alérgeno em *Komagataella phaffii*.

5.1.3. Expressão e purificação do alérgeno rPoly p 5 em *K. phaffii*

Conforme descrito no item **4.4.5**, as placas contendo as células X-33/pPICZαA-*poly* p 5 (Figura 11), provenientes de colônias positivas, foram crescidas overnight em meio YPD-agar (Yeast Extract peptone Dextrose) – (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, dextrose (glicose) a 2%, ágar a 2% e Zeocina a 100 μg/mL) a 28°C. Uma colônia isolada da placa foi selecionada para prosseguir com a expressão.

Figura 10. Placa contendo colônias de X-33/pPICZαA-*poly p 5* em meio YPD.



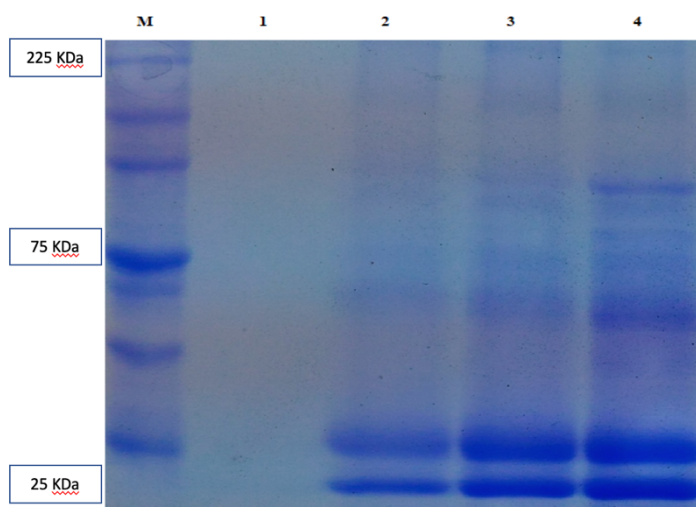
A expressão da proteína recombinante rPoly p 5 em *K. Phaffii* foi analisada pela medida de DO_{600} nm, no período de 0 – 72 horas de indução, sendo o metanol 1% adicionado final ao meio BMMY a cada 24 horas (Tabela 2). Após centrifugação em baixa velocidade e descarte do precipitado, o sobrenadante foi coletado e analisado por SDS-PAGE 12% (**Figura 11**).

Tabela 2. Acompanhamento do nível de expressão da proteína alergênica rPoly p 5 em *K. phaffii*, após a indução de metanol 1%.

Tempo de incubação (h) da cultura de rPoly	DO_{600} nm (alíquotas retiradas da cultura)*
T_0	0,874
T_{24}	6,3
T_{48}	8,3
T_{72}	10,1

(*) As medidas de DO foram tomadas através de diluições necessárias para cada leitura no espectro.

Figura 11. Análise de SDS-PAGE da expressão de rPoly p 5 em *K.phaffii* induzida a 28°C com metanol (1%). **(M)** Broad Range Protein Molecular Weight Markers – PROMEGA – 608-274-4330. **(1)** 0 horas após a indução. **(2)** 24 horas. **(3)** 48 horas. **(4)** 72 horas.

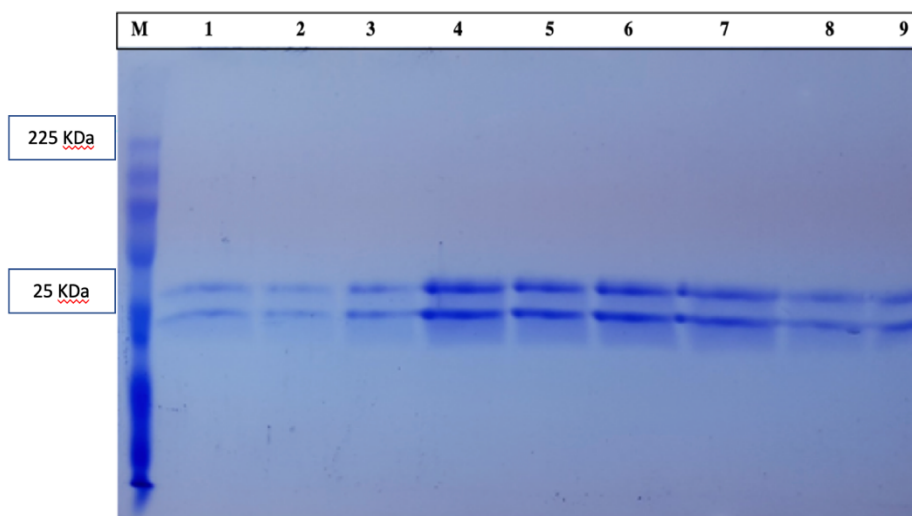


De acordo a **Figura 11**, podemos avaliar que o melhor nível de expressão do alérgeno rPoly p 5 na cepa x-33 ocorreu com 72h de indução, com massa molecular aproximadamente de 23 kDa (HOFFMAN, 1993).

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. Por outro lado, 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 foi utilizada a técnica de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA-Agarose.

Para a realização da purificação, a amostra de T₇₂ horas foi previamente filtrada em membranas conforme descrito em Materiais e Métodos. Após filtração, concentração e ressuspensão da amostra no tampão selecionado para a coluna de afinidade His-Trap Ni⁺², a amostra foi eluída com 75 mM de Imidazol. A **Figura 12** demonstra o resultado da análise, realizada por SDS-PAGE a 12%, do perfil proteico das frações eluídas da coluna referentes à proteína rPoly p 5 purificada.

Figura 12. Purificação do alérgeno recombinante rPoly p 5 por cromatografia de afinidade em Ni-NTA agarose e análise por SDS-PAGE 12% das frações eluídas da coluna. (M): Broad Range Protein Molecular Weight Markers – PROMEGA – 608-274-4330. (A): 1 - 9: Amostras rPoly p 5 eluídas da coluna Ni-NTA com 75 mM de Imidazol.



A partir da **Figura 12** também 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 cerca de 30 kDa e outra de 23 kDa (banda esperada da proteína Poly p 5).

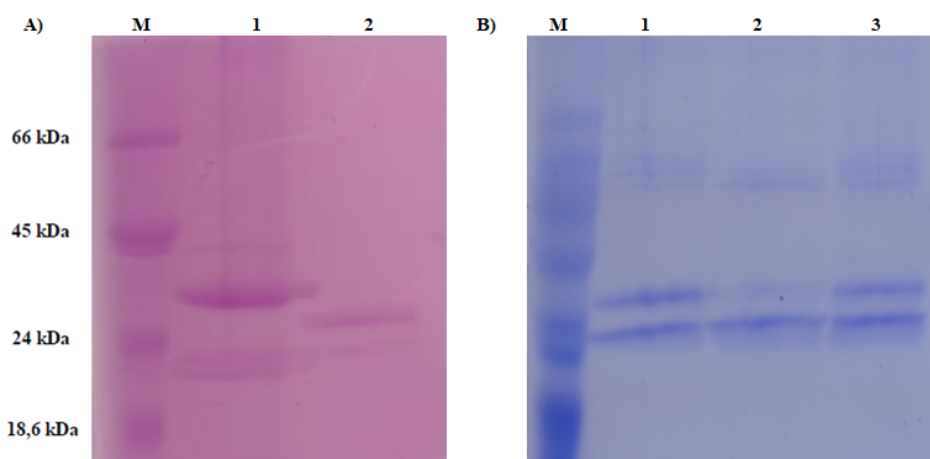
A presença da dupla banda do Antígeno 5 em SDS-PAGE foi descrito por Henriksen et al (2001) e por Vinzón et al (2010), que verificaram as mesmas características para este alérgeno, após todo os processos de purificação, em *Vespula vulgaris* e também em *Polybia scutellaris*, respectivamente. Em ambos 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, *Komagataella phaffii* possui um baixo nível de N-glicosilação. O comprimento das cadeias de oligossacarídeos adicionadas pós-traducionalmente às proteínas em *K. phaffii* (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 *K. phaffii*.

Para verificarmos a glicosilação de rPoly p 5 e sua possível remoção, foi realizado um experimento utilizando o método de coloração com ácido periódico-Schiff

(PAS) e a enzima PNGase-F (New England BioLabs), respectivamente (Figura 13 A,B). Os resultados obtidos com PAS, método primariamente utilizado para identificar resíduos de glicose, demonstraram que o rPoly p 5 contém resíduos de glicosilação e após o tratamento com a PNGase-F houve uma diminuição dessa glicosilação, porém, não foi possível remover completamente os resíduos da banda superior, de 33 kDa. A PNGase-F é uma amidase e sua utilização se constitui num método enzimático mais eficaz para remover quase todos os oligossacarídeos N-ligados das glicoproteínas, já que esta enzima cliva entre os resíduos mais internos de GlcNAc e asparagina de oligossacarídeos ricos em manose.

Figura 13. Análise de glicosilação e deglicosilação de rPoly p 5 com PNGase-F (**M**): Broad Range Protein Molecular Weight Markers – PROMEGA – 608-274-4330. (A) Coloração de Schiff: 1 – Veneno bruto de *Polybia paulista*, 2 – rPoly p 5. (B) Tratamento com a enzima PNGase-F: 1 e 3 – 20 ng de rPoly p 5, 1h de incubação com PNGase-F, 2 – 20 ng de rPoly p 5, 24 horas de incubação overnight.



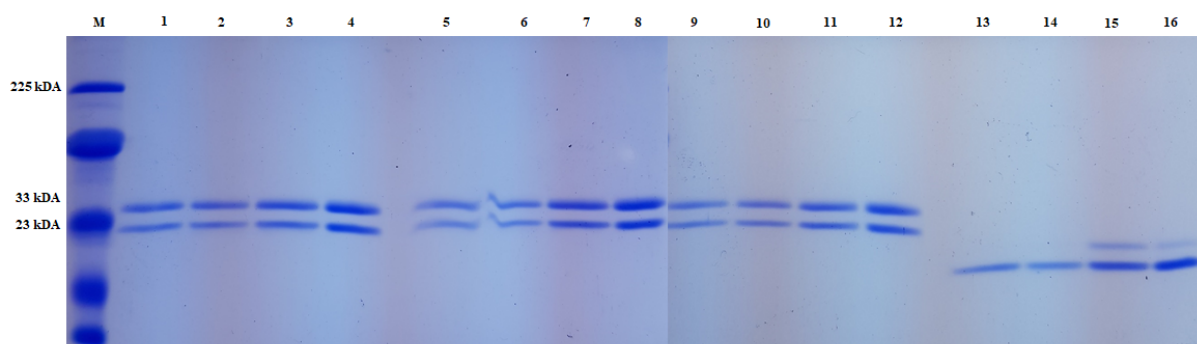
A amostra de rPoly 5 purificada foi submetida a sequenciamento no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Unesp-Rio Claro-SP, e os resultados mostraram fragmentos do α -factor (peptídeo sinal de *Saccharomyces cerevisiae*), contidos na sequência de rPoly p 5 (**Tabela 3**). Apenas as sequências identificadas como sendo peptídeo sinal foram selecionadas na tabela, sendo que os dados brutos não estão mostrados. Com base no sequenciamento, a fim de remover o peptídeo sinal, utilizamos a enzima enteroquinase bovina (GenScript). A enteroquinase é uma protease específica que cliva após uma lisina precedida por quatro ácidos aspárticos: Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. O sítio da enzima enteroquinase foi propositalmente adicionado entre o peptídeo sinal e o gene *poly* p 5, conforme o esquema abaixo.

Após a clivagem, foi realizada uma purificação utilizando uma coluna de afinidade His-Trap Ni+2 a fim de separar a proteína desejada.

Tabela 3. Análise do sequenciamento de rPoly p 5.

Nome da proteína	Uniprot	Peso molecular	Organismo	Protein Identification Probability
Peptide chain release factor 1	P30775	46 kDa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
A-factor-processing enzyme	Q06010	117 kDa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.99

Figura 14. Proteína rPoly p 5 tratada com Enteroquinase. (M): Broad Range Protein Molecular Weight Markers – PROMEGA – 608-274-4330. **1-4:** 0,01 U de Enteroquinase + rPoly p 5 com 1, 3, 5 e 16 horas de incubação; **5-8:** 0,1 U de Enteroquinase + rPoly p 5 com 1, 3, 5 e 16 horas de incubação; **9-12:** 1 U de Enteroquinase + rPoly p 5 com 1, 3, 5 e 16 horas de incubação. **13-16:** Controle positivo da protease.



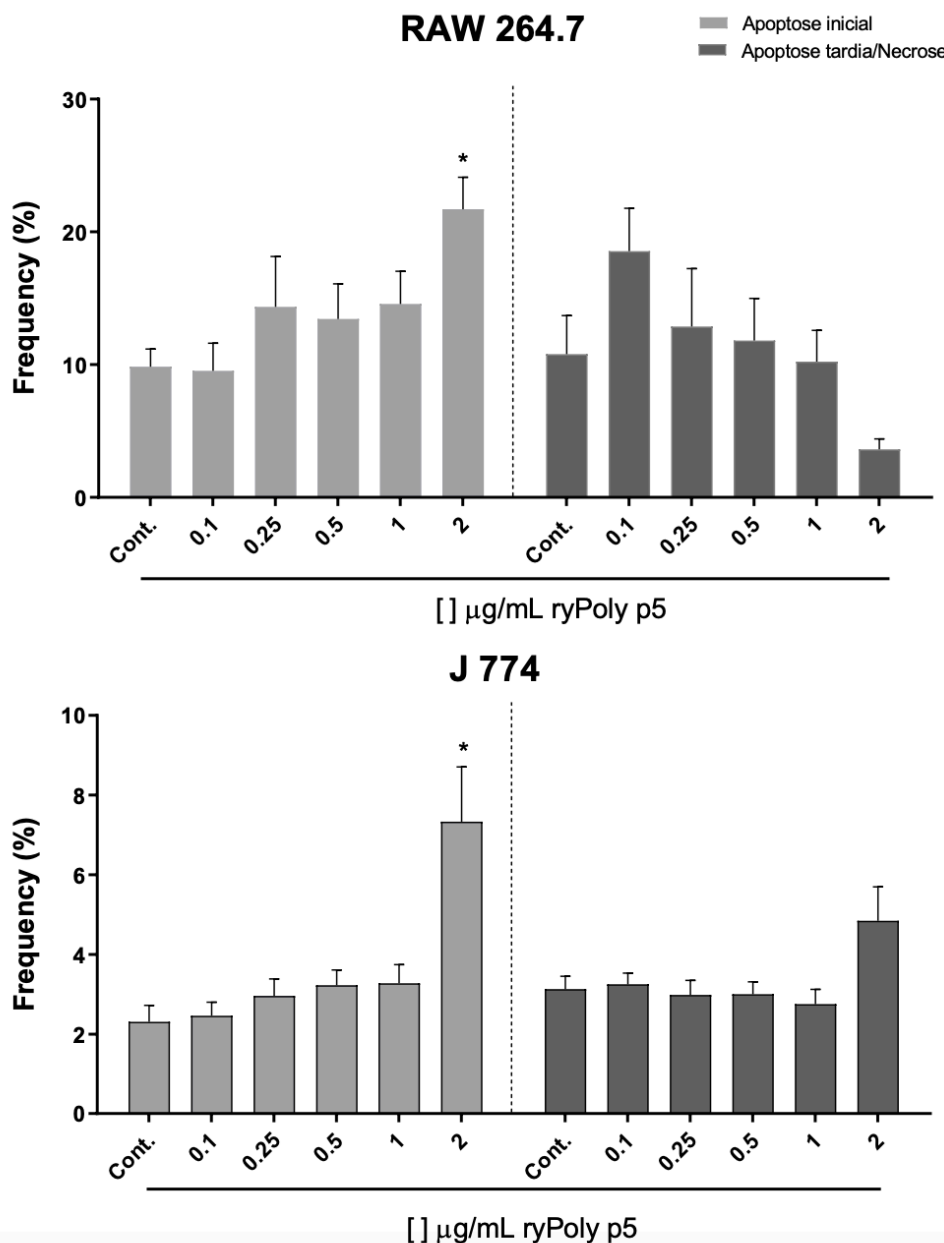
Conforme pode ser observado, o resultado obtido através do tratamento de rPoly p 5 com diferentes tempos de incubação e concentrações da enzima enteroquinase também foi negativo (**Figura 14**), pois mesmo após o tratamento e a purificação da proteína tratada em coluna de afinidade, foi observada a presença da banda superior. Foram também realizados experimentos de cromatografia de filtração em gel Sephadex® G-75 e G-50, porém, mesmo utilizando esses sistemas, a banda dupla prevaleceu.

Em decorrência dos resultados obtidos, concluímos que a dupla banda é uma característica intrínseca da molécula quando expressa em levedura *K. phaffii*. A proteína recombinante rPoly p 5 purificada foi então utilizada para os ensaios com macrófagos intraperitoneais de camundongos, considerando que, o padrão de expressão de duas bandas (em SDS-PAGE) tem sido relatadas para o alérgeno Antígeno 5 (inclusive após a expressão em células de insetos) por demais pesquisadores em venenos de outros insetos Hymenoptera - Poly s 5 e Sol i 3 (VINZÓN et al, 2010; SCHIENER et al, 2017). E, experimentos como de ativação de basófilos e de imunoreatividade, têm sido normalmente realizados utilizando Ag5 recombinante na conformação de dupla banda.

5.2. Avaliação de viabilidade em J774 e RAW 264.7

A citotoxicidade vinculadas como efeito do alérgeno rPoly p 5 em linhagem de células tumorais J774 e RAW 264.7 foram investigadas empregando análises de apoptose, apoptose tardia e necrose para avaliar a indução de morte celular e danos promovidos por esse alérgeno. Células crescidas na ausência de estímulos exógenos foram utilizadas como controle. A **Figura 15** mostra a viabilidade de células tumorais de J774 e RAW 264.7 após 48 horas de estímulos *in vitro* com rPoly p 5 nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 µg/mL.

Figura 15. Análise de viabilidade celular (a identificação de células apoptóticas e necróticas) de cultura de linhagem macrofágica J744 e RAW 264.7 após tratamento com diferentes concentrações de rPoly p 5 (0.1µg/mL; 0.25µg/mL; 0.5µg/mL; 1µg/mL; 2µg/mL). O gráfico indica a porcentagem de células viáveis, na fase inicial de apoptose (barras cinza-claro) e na fase tardia de apoptose (necrose) (barras cinza-escuro). As barras representam média $\pm$ (E.P.M) da nos sobrenadantes das culturas.



Nesta análise, a anexina, utilizada para a avaliação de viabilidade celular, se liga à fosfatidilserina (PS) que é normalmente encontrada apenas na parte intracelular da membrana plasmática em células saudáveis, mas durante a apoptose inicial, a assimetria da membrana é perdida e a PS é translocada para a parte externa da membrana. A ligação da anexina V por si só não consegue diferenciar entre células

apoptóticas e necróticas, sendo que, para esta distinção, é utilizado o marcador 7-amino-actinomicina D (7-AAD). Deste modo, as células apoptóticas precoces excluíram o 7-AAD da ligação, enquanto as células apoptóticas em estágio avançado irão se corar positivamente, devido à passagem desse corante para o núcleo onde se liga ao DNA, emitindo uma fluorescência que pode ser analisada por citometria de fluxo.

Na **Figura 15** podemos observar que, para ambas as linhagens celulares, a indução de apoptose se mostrou dose-dependente e, que a dose de 2 µg/mL de rPoly p 5 teve uma atividade tóxica para as células, estimulando a apoptose. Estes resultados foram importantes para definir a concentração de rPoly p 5 utilizada para experimentos posteriores.

A partir disso, a dosagem de 1 µg/mL do alérgeno rPoly p 5, que foi utilizada em todas as análises com macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c. Esses experimentos foram realizados em dois grupos. Um grupo sem LPS (controle negativo) e outro grupo com LPS (controle positivo). Os macrófagos foram estimulados ou não com rPoly p 5 e cultivados por 48 horas à 37°C.

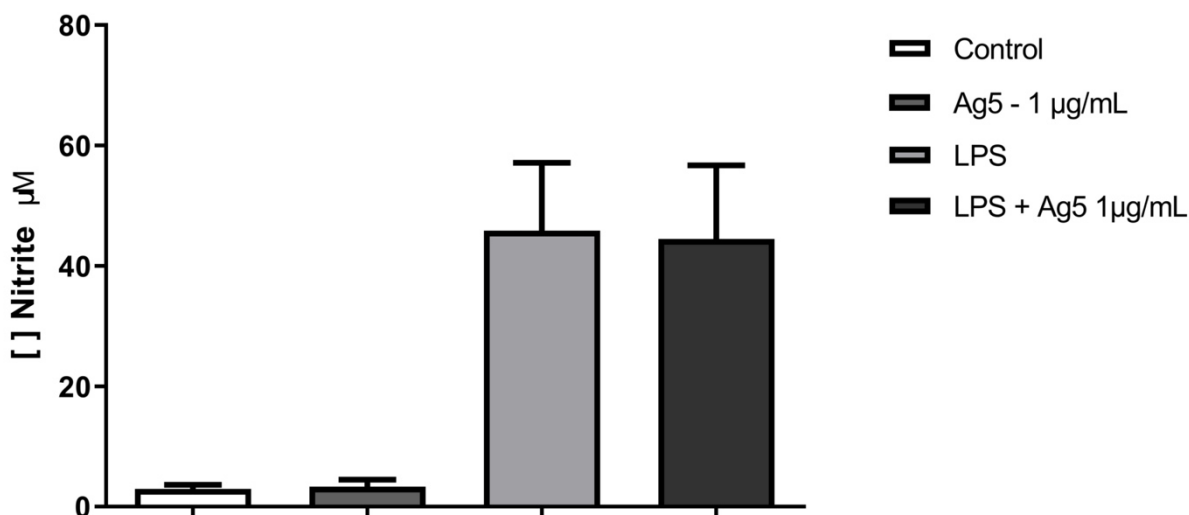
5.3. Quantificação de Óxido nítrico

Para as análises de quantificação de óxido nítrico (NO) foi utilizado um valor amostral (n)=16 animais. As células de macrófagos intraperitoneais, em concentrações ajustadas, foram tratadas com 1 µg/mL de rPoly p 5, na presença/ausência de LPS e analisadas para verificar seus efeitos na produção de NO. Como é possível observar na **Figura 16**, o primeiro tratamento, que consiste no rPoly p 5 sem LPS, não foi capaz de induzir a produção de NO nos sobrenadantes de macrófagos na concentração de 1 µg/mL de rPoly p 5, quando comparado com o grupo controle.

O segundo tratamento (controle positivo), com a indução do LPS, produziu uma maior liberação de nitrito nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais estimulados com rPoly p 5 quando comparado ao tratamento sem LPS. Esse resultado já era esperado, pois o NO pode ser produzido pela ativação dos fagócitos por IFN-γ e LPS a partir da indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (ABREU, 2017; SCURO et, al., 2004). Apesar de verificarmos uma maior concentração de NO no

grupo rPoly p 5 + LPS quando comparado ao controle sem LPS, o resultado não foi significativo em comparação ao grupo controle positivo, tratado somente com LPS.

Figura 16. Gráficos representativos do efeito do rPoly p 5 na produção de óxido nítrico por macrófagos intraperitoneais da linhagem BALB/c. Células foram estimuladas com o estímulo pró-inflamatório (LPS a 1 µg/mL) enquanto a outra parte não recebeu estímulo. Concomitantemente à adição deste estímulo, as células foram incubadas com rPoly p 5 na concentração de 1 µg/mL por 48h, sendo que os controles receberam apenas meio de cultura. As barras representam média ± (E.P.M). (N=16).



5.4. Análise de citocinas pró e anti-inflamatórias

Para avaliarmos o efeito do rPoly p5 na modulação do perfil de citocinas produzidas por macrófagos intraperitoneais de camundongos, sobrenadantes de culturas de macrófagos estimulados (Figuras 17 a 20 -barras à direita) ou não (Figura 17 a 20 - barras à esquerda) com o estímulo pró-inflamatório (LPS - 1 µg/mL) e sob efeito do tratamento com rPoly p5 (1 µg/mL) foram utilizados em imunoenaios baseados na detecção simultânea de analitos por citometria de fluxo através do kit LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) (Biolegend), conforme descrito em Material e Métodos item 4.12. Para esse ensaio foi utilizado um valor amostral de 44 camundongos.

Por meio dessas análises podemos observar que houve uma diminuição significativa na produção das citocinas TNF-α e MCP-1, quando tratadas com rPoly p 5 + LPS, em comparação ao grupo tratado somente com LPS (controle positivo). Podemos inferir, através desses resultados, que o alérgeno rPoly p 5 age inibindo a

produção dessas citocinas, visto que o LPS é conhecido por induzir a expressão de TNF- α e MCP-1 (**Figura 17**).

Em contrapartida observamos um aumento da secreção de citocina IL-1 β quando a cultura foi tratada apenas com rPoly p 5, sem a adição de LPS, diferindo de dados encontrados utilizando células de linhagens macrofágicas J774 e RAW 264.7 (dados ainda não publicados, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa), onde a secreção de IL-1 β não apresentou um aumento significativo.

Na **Figura 18** pode-se observar uma tendência para o aumento na produção das citocinas IL-6 e IL-10 em cultura, quando estas foram cultivadas somente na presença de 1 μ g/mL de rPoly p 5, sem adição de LPS. Porém, os resultados encontrados não mostraram diferenças em comparação com os controles não estimulados. Já as dosagens da secreção *in vitro* das citocinas IL-1 α , IL-12p70, IL-17A, IL-27, IFN- β , IFN- γ , e GM-CSF não mostraram alterações significativas, quando os cultivos foram estimulados com rPoly p 5 em comparação com os grupos controles, como pode ser observado nas **Figuras 19 e 20**.

Figura 17. Gráficos representativos da produção de citocinas nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais BALB/c estimulados com 1 µg/mL de rPoly p 5 na ausência (barra a esquerda) ou presença de 1 µg/mL de LPS (barra a direita), coletadas em 48 horas de cultivo. As barras representam média ± E.P.M. das concentrações das respectivas citocinas: TNF-α (A), MCP-1 (B) e IL-1β (C). (N= 44) (*) p<0.05 – Teste de Mann-Whitney.

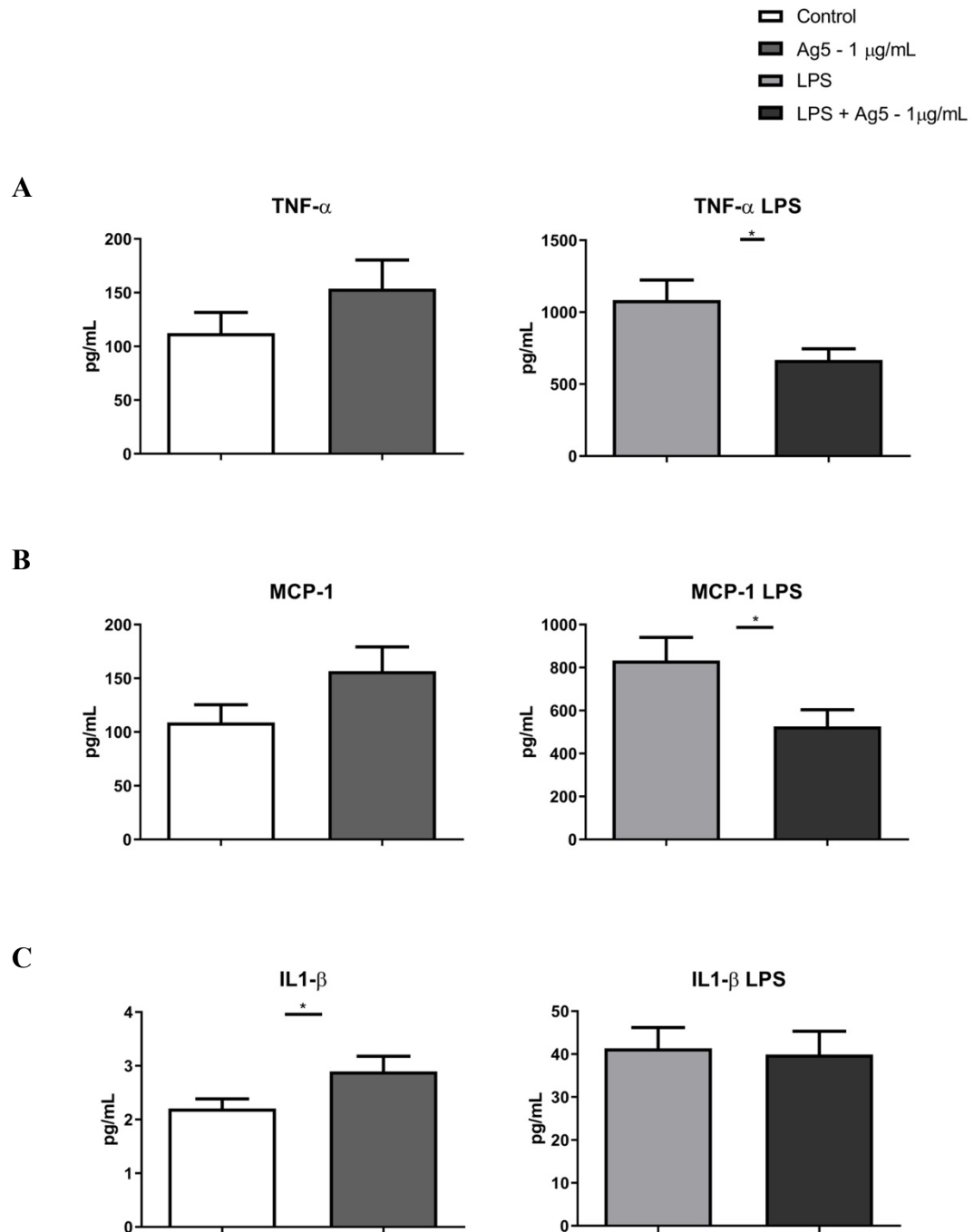


Figura 18. Gráficos representativos da produção de citocinas nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais BALB/c estimulados com 1 µg/mL de rPoly p 5 na ausência (barra a esquerda) ou presença de 1 µg/mL de LPS (barra a direita), coletadas em 48 horas de cultivo. As barras representam média $\pm$ E.P.M. das concentrações das respectivas citocinas: IL-6 (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C). (N= 44) (*) $p < 0.05$ – Teste de Mann-Whitney.

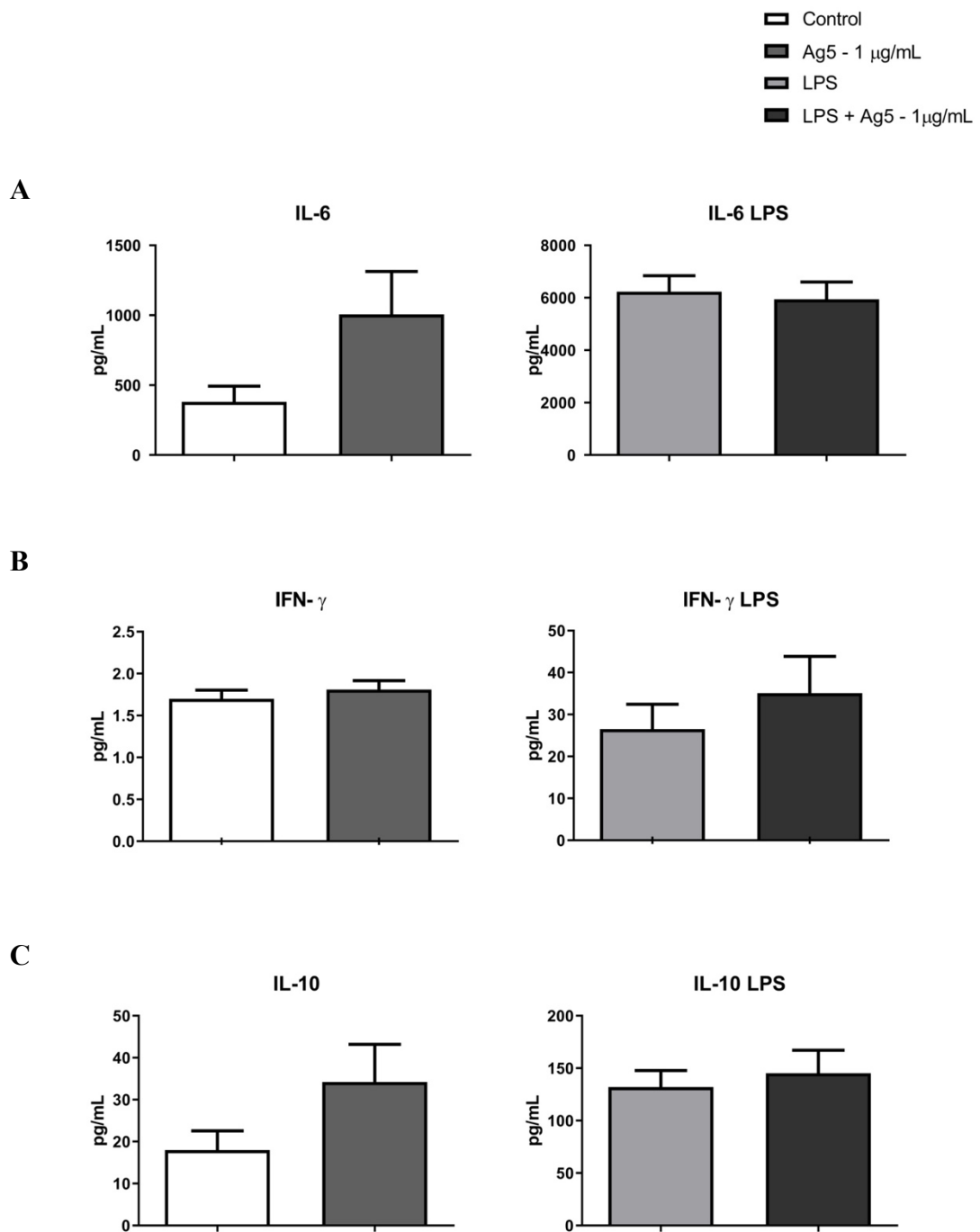


Figura 19. Gráficos representativos da produção de citocinas nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais BALB/c estimulados com 1 µg/mL de rPoly p 5 na ausência (barra a esquerda) ou presença de 1 µg/mL de LPS (barra a direita), coletadas em 48 horas de cultivo. As barras representam média ± E.P.M. das concentrações das respectivas citocinas IFN- β (A), IL-1^a (B) e IL-27 (C). (N= 44) (*) p<0.05 – Teste de Mann-Whitney.

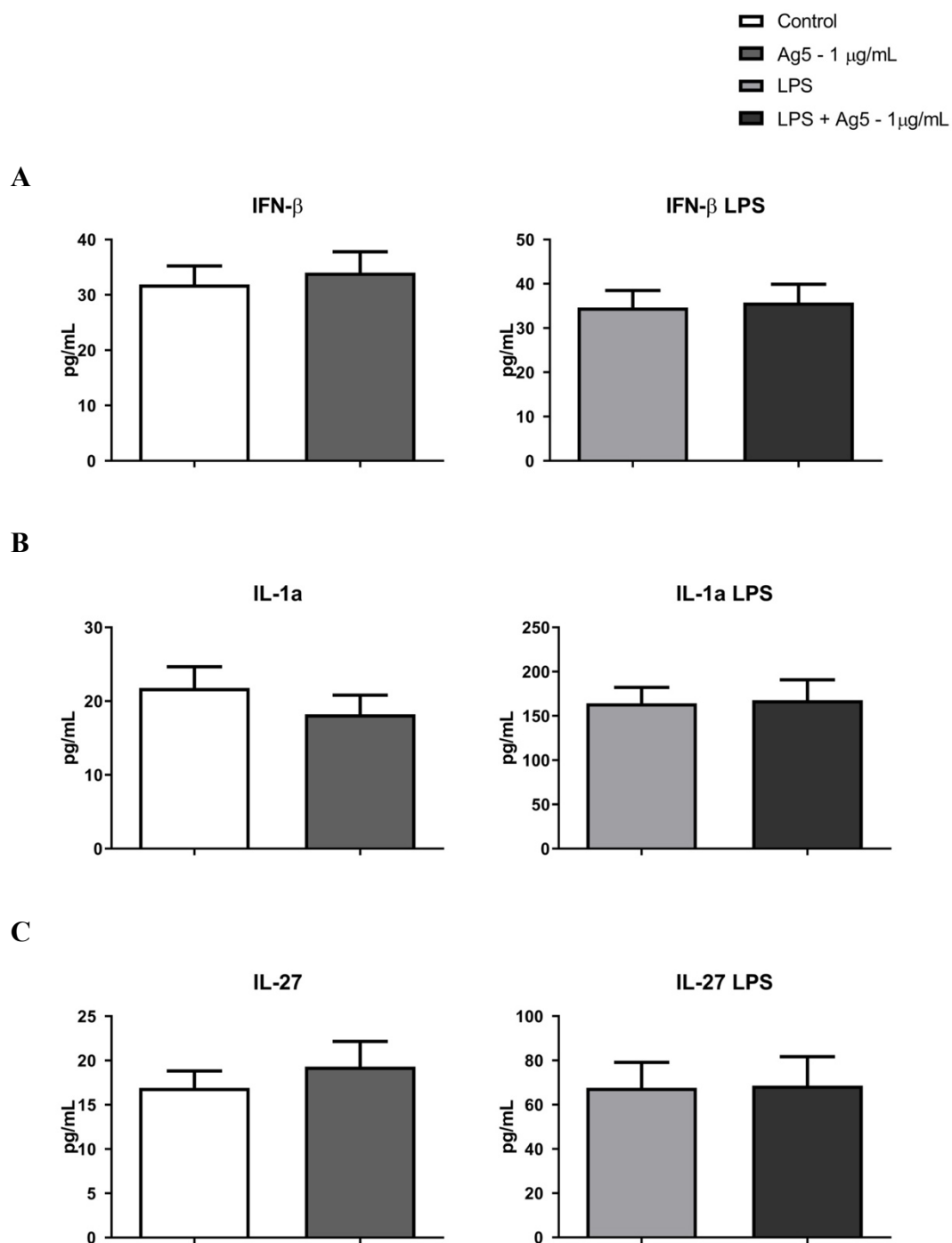
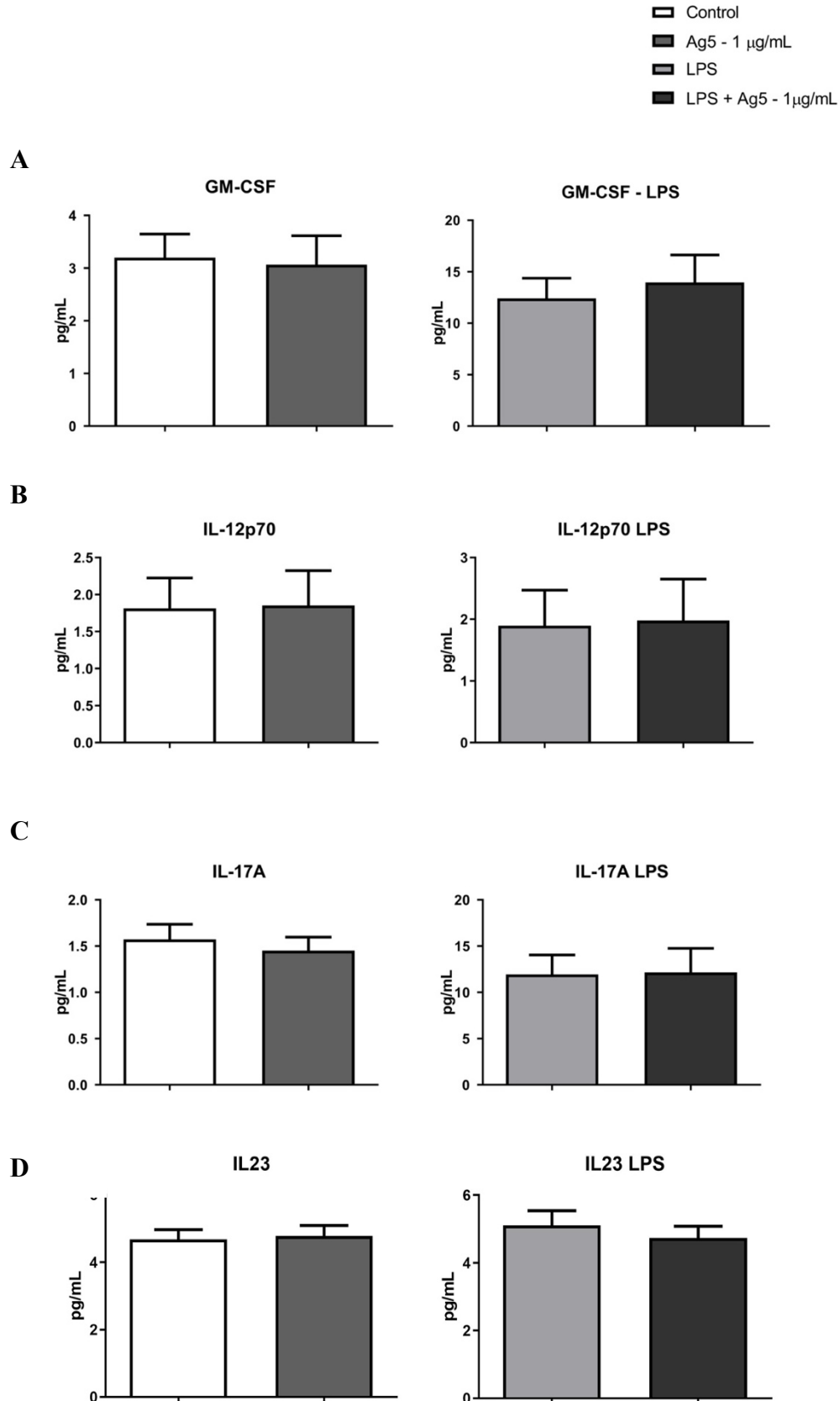


Figura 20. Gráficos representativos da produção de citocinas nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais BALB/c estimulados com 1 µg/mL de rPoly p 5 na ausência (barra a esquerda) ou presença de 1 µg/mL de LPS (barra a direita), coletadas em 48 horas de cultivo. As barras representam média ± E.P.M. das concentrações das respectivas citocinas GM-CSF (A), IL-12p70 (B), IL-23 (C) e IL-17^a (D) (N= 44) (*) p<0.05 – Teste de Mann-Whitney.

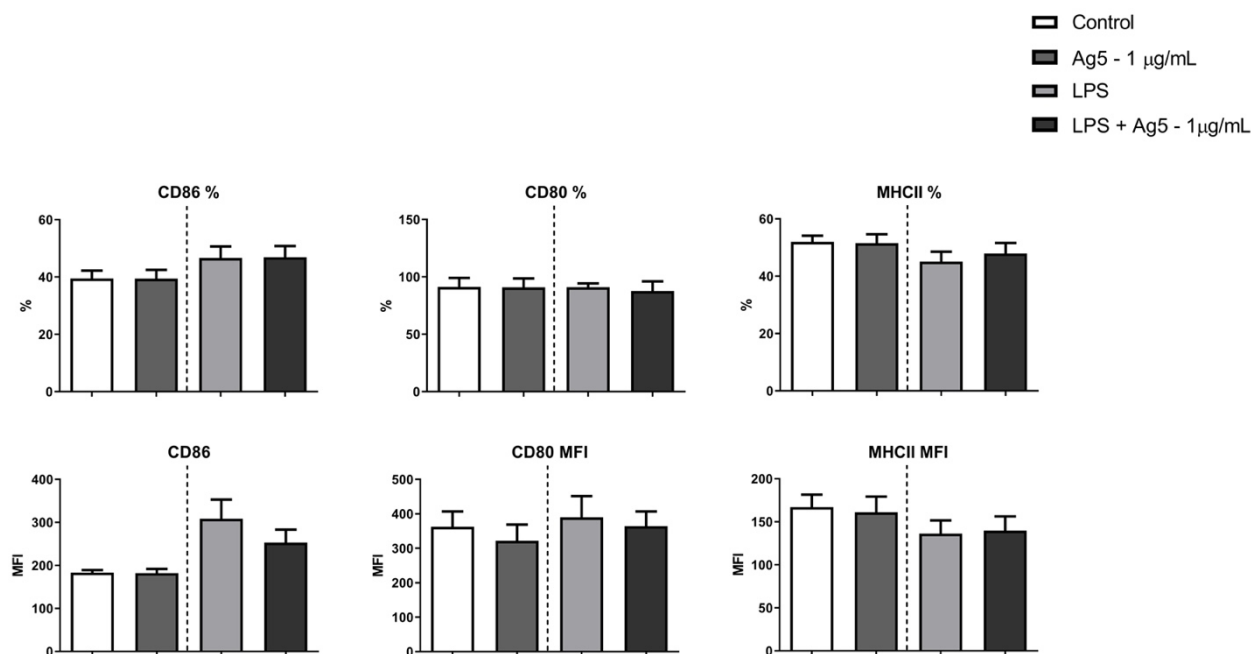


5.5 Análise de moléculas co-estimulatórias

Para avaliar o efeito do estímulo com rPoly p 5 na expressão celular das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e em MHCII, parte das culturas de macrófagos intraperitoneais foram estimuladas com o estímulo pró-inflamatório (LPS na concentração de 1 µg/mL), enquanto a outra parte não recebeu estímulos. Concomitantemente à adição destes estímulos, as células foram incubadas com rPoly p 5 na concentração de 1 µg/mL e cultivadas por 48h, sendo que as culturas controles receberam apenas meio de cultura. Após este período, foram realizados ensaios para determinação da porcentagem ou intensidade de fluorescência (MFI) da expressão de CD80, CD86 e MHCII em macrófagos por método de imunofluorescência por citometria de fluxo, conforme descrito previamente por SIMIONI et al. (2017).

A determinação das populações positivas foi estabelecida tomando como base a fluorescência obtida nas amostras marcadas com os respectivos anticorpos controles de isotipos para os marcadores analisados, conforme descrito no item 4.11 de Material e Métodos. Foram avaliadas as porcentagens de células marcadas positivamente para os marcadores CD80 e CD86 e a expressão relativa foi determinada pela média geométrica da intensidade de fluorescência do fluorocromo associado aos respectivos anticorpos de detecção (MFI) (**Figura 21**).

Figura 21. Gráficos representativos da expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e MHCII em células de macrófagos intraperitoneais de camundongos estimulados com 1 µg/mL de rPoly p 5. As análises foram feitas em células F4/80⁺ viáveis, comparando-se a porcentagem de células positivas para os marcadores CD80, CD86 e MHCII, bem como a expressão relativa destes marcadores, estabelecida pela média da incidência de fluorescência (MFI). As barras representam média ± E.P.M,



(N=17) * $p < 0.05$.

Os gráficos (**Figura 21**) e os histogramas (**Figuras 22 e 23**) mostram os resultados obtidos para avaliação dos marcadores mencionados anteriormente. Houve um aumento na intensidade de fluorescência nas moléculas CD86 no controle positivo (com LPS) quando comparada com o controle negativo (sem LPS), e uma pequena diminuição da intensidade de fluorescência desse marcador, embora não significativa, do tratamento com rPoly p 5 + LPS em comparação com o controle positivo, porém, essa diferença não foi vista na frequência de células positivas para o marcador CD86.

Nos histogramas das **Figuras 22 e 23** são mostrados também os controles de isotipos. Esses controles foram analisados a fim de evitar interferência de falsa positividade, eliminando a fluorescência inespecífica utilizando anticorpos dos mesmos isotipos usados nos experimentos de marcadores de moléculas co-estimulatórias.

Podemos observar que não houve alterações quanto às frequências de células positivas, ou expressão dos marcadores CD80, CD86 e MHCII em culturas tratadas com rPoly p 5, estimuladas ou não com indutor pró-inflamatório.

Figura 22. Expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e MHCII em células de macrófagos intraperitoneais de camundongos estimulados com rPoly p 5. As análises de expressão das moléculas co-estimulatórias foram feitas em células F4/80⁺ (células viáveis). (A) Controle – Sem estímulo. (B) 1 µg/mL rPoly p 5. Os histogramas em cinza representam o controle de isótopos, enquanto que os histogramas em preto são representativos das leituras com anticorpos específicos CD80, CD86 ou MHCII.

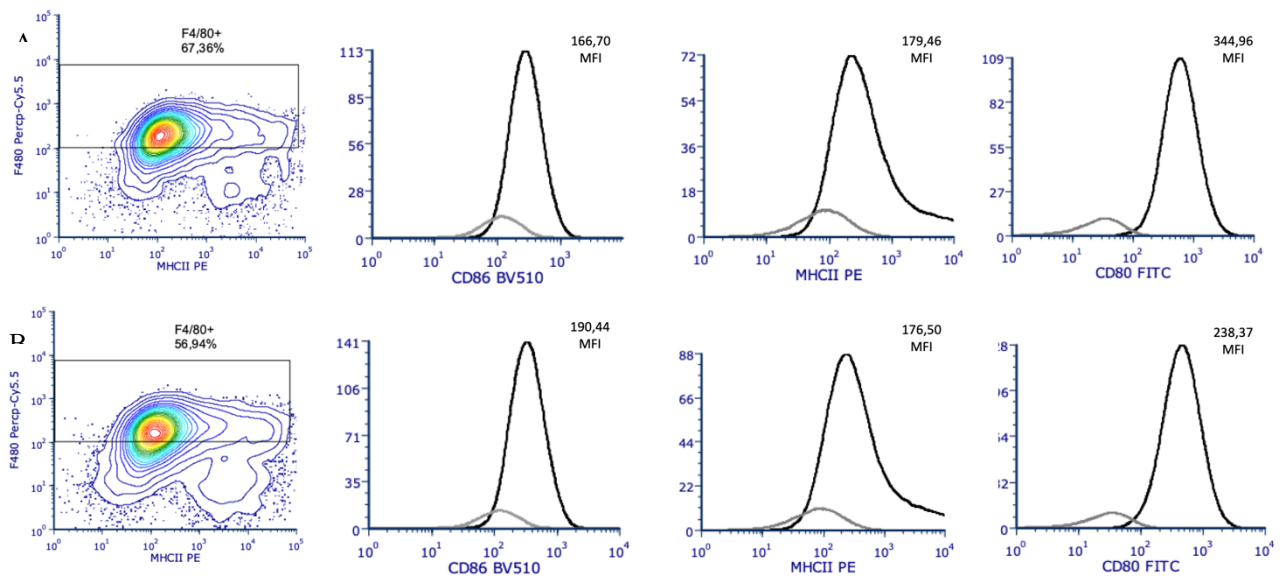
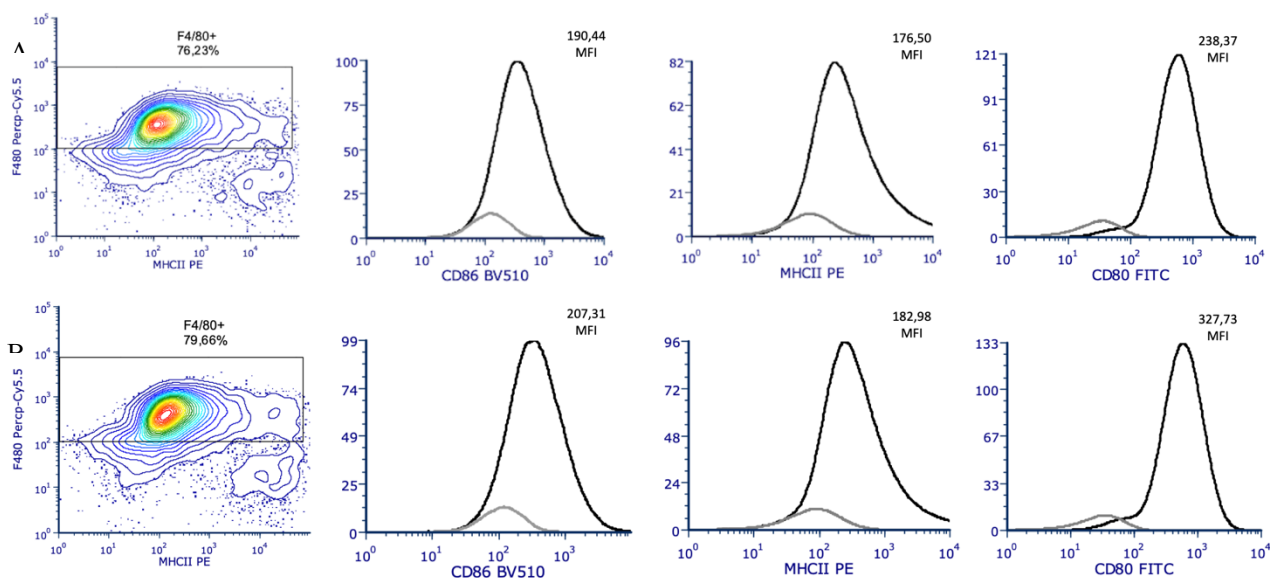


Figura 23. Expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e MHCII em células de macrófagos intraperitoneais de camundongos estimulados com rPoly p 5 e 1 µg/mL LPS. As análises de expressão das moléculas co-estimulatórias foram feitas em células F4/80⁺ (células viáveis). (A) Controle positivo – LPS. (B) LPS + 1 µg/mL rPoly p 5. Os histogramas em cinza representam o controle de isótopos, enquanto que os histogramas em preto são representativos das leituras com anticorpos específicos CD80, CD86 ou MHCII.

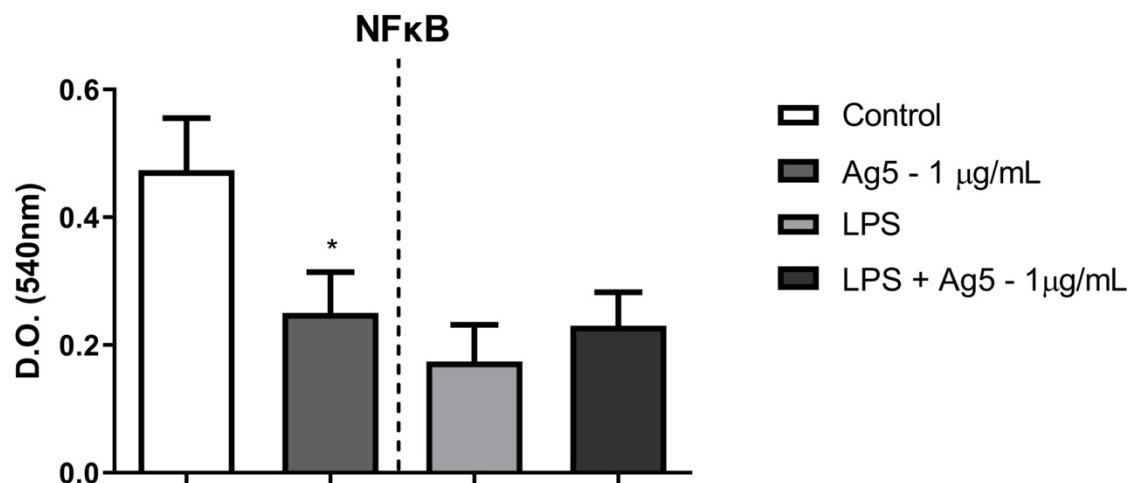


5.6. Expressão de NF-kB

As análises em macrófagos da expressão da forma fosforilada de NF-kB foram também realizadas na ausência/presença do estímulo LPS. Ambos as culturas, tratada e controle, foram estimuladas por 48 horas com 1 µg/mL de rPoly p 5 e mantidas em cultura em uma temperatura constante de 37°C, em incubadora com 5% de CO₂.

Podemos verificar pelos resultados apresentados na **Figura 24** que houve uma diminuição da expressão da forma fosforilada de NF-kB no núcleo macrofágico, quando as culturas dessas células foram tratadas somente com o alérgeno recombinante rPoly p 5, sem adição de um estímulo pró-inflamatório. Entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada em comparação com o grupo controle positivo, quando na presença de um estímulo pró inflamatório (LPS) e com ou sem estímulo de 1 µg/mL de rPoly p 5.

Figura 24. Gráfico representativo da análise da forma ativada de NF-kB em macrófagos intraperitoneais de camundongos estimulados com 1µg/mL de rPoly p 5, na ausência ou presença de LPS, por 48 horas. As barras representam média ± E.P.M. (N= 14) (*) p<0.05 – Teste de Mann-Whitney.



6. Discussão

Acidentes envolvendo insetos sociais da ordem Hymenoptera 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). O veneno de Hymenoptera possui uma diversa variedade de componentes, dentre os quais, histamina, cininas vasoativas, serotonina, Fosfolipase A, Fosfolipase B, Hialuronidase, Antígeno 5 e Mastoparanos.

O Ag5 é um dos alérgenos mais utilizados, juntamente com a Fosfolipase, para o diagnóstico específico das reações alérgicas, 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). No entanto principalmente em Hymenopterans, a sua função ainda é desconhecida. O estudo dessa proteína imunogênica é de fundamental importância para verificarmos os mecanismos de ação, induzidos por ela, em uma célula de defesa, como por exemplo nas células de linhagens macrofágicas, que são importantes pois iniciam a imunidade inata, promovendo a resposta inflamatória ou anti-inflamatória e direciona a resposta da imunidade adaptativa.

A obtenção e purificação de um determinado alérgeno natural, a partir dos venenos de vespas é um processo complicado de baixo rendimento e 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.

A presença da dupla banda de rPoly p 5 em SDS-PAGE, relatada neste trabalho, já havia sido descrita por King et al (2001), Vinzón et al (2010) e Schiener et al (2017), os quais visualizaram o mesmo fenômeno para este alérgeno, após todo os processos de purificação, em *Vespa vulgaris*, em *Polybia scutellaris* e também em *Solenopsis invicta*, respectivamente. Nestes 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, o que não impediu a sua utilização para ensaios com células, tais como teste de ativação de basófilo (SCHIENER et al., 2017). Assim como PLA1, o Ag5 nativo de *P. paulista* possui sítios de N-glicosilação, porém, não há indícios de epítomos de carboidratos determinantes de reatividade cruzada (PEREZ-RIVEROL et al., 2018).

Nas proteínas dos himenópteros ocorre a N-glicosilação, onde os oligossacarídeos (glicanos) se ligam ao átomo de nitrogênio presentes nos resíduos do aminoácido asparagina (Asn) (ALTMANN, 2007). A glicosilação é considerada irrelevante clinicamente por ser incapaz de gerar uma reação alérgica, devido ao fato de ser uma estrutura monovalente. Para haver degranulação das células efectoras e liberação das citocinas, é necessário que ocorra a ligação entre alérgeno e IgE ligadas aos receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) destas células, sendo que os alérgenos precisam ter uma estrutura no mínimo bivalente para que ocorra essa ligação (YOKOI et al., 2017; MOITINHO et al., 2020).

Resultados de trabalhos anteriores, publicados pelo nosso grupo, mostraram que a forma recombinante de Poly p 5, obtida na forma solúvel, através da expressão em *P. pastoris* é alergênica (BAZON et al., 2017) e, a partir desses resultados, decidimos investigar se o rPoly p 5 age como uma proteína moduladora da resposta imune inata em macrófagos extraídos do peritônio murino, influenciando na produção de citocinas, óxido nítrico, moléculas co-estimulatórias e fatores de transcrição.

Antes da realização dos testes de rPoly p 5 em macrófagos peritoneais de camundongos, foram efetuados ensaios para verificar a toxicidade desta molécula em células de linhagens tumorais J774 e RAW 264.7. Estas linhagens tumorais foram utilizadas por serem mais resistentes e suportarem maior situação de estresse quando comparada aos macrófagos obtidos *in vivo*. Além disso, a quantidade de macrófagos peritoneais obtidos diretamente de um único camundongo geralmente é menor quando comparada com a quantidade de células que podem ser obtidas em cultura de linhagens. Ensaios de viabilidade celular demonstraram que a dose de 2 µg/mL de rPoly p 5 possui atividade tóxica para as células, sendo assim a dose estipulada para os ensaios com macrófagos peritoneais de camundongos foi de 1 µg/mL de rPoly p 5. Estes resultados sugerem que a dose utilizada em todas as análises com as células macrofágicas em nosso estudo foi realmente adequada, principalmente nas análises

de liberação de citocinas, nas quais avaliamos a modulação da resposta imune pelos macrófagos, sem qualquer risco de estarem associados à presença de células mortas.

Enquanto a inflamação alérgica se instala no organismo, ela se manifesta externamente por meio de sinais como inchaço, edema, dor e vermelhidão da pele (MEDZHITOV, 2008). Porém, no interior da célula, ocorre a produção de óxido nítrico (NO) e, posteriormente, uma cascata de mediadores pró-inflamatórios e citocinas são liberadas, o que serve para desencadear o processo inflamatório em relação à eliminação do antígeno. Isso inclui interleucinas, ou seja, IL-1 β e IL-6, e fator de necrose tecidual- α (TNF- α) que atraem outras quimiocinas inflamatórias e também ajudam na depuração (SABA et al., 2017). Todos esses mediadores pró-inflamatórios e citocinas levam à ativação da via inflamatória clássica, ou seja, as vias NF- κ B e MAPK (DINARELLO, 2000; ZHANG et al., 2002). A ativação dessas vias regula uma resposta inflamatória sistêmica para neutralizar a partícula invasora. Embora a inflamação seja um mecanismo de defesa natural contra invasões estranhas, as respostas inflamatórias descontroladas e generalizadas têm consequências graves para o organismo. Portanto, é necessário o controle oportuno da inflamação pelo próprio organismo ou por algum agente exógeno. Foi reconhecido que suprimir a produção excessiva de NO é uma meta significativa no tratamento de doenças inflamatórias.

No presente estudo, pudemos verificar que ocorreu um aumento na produção de óxido nítrico na cultura macrofágica, quando as culturas foram estimuladas com LPS a 1 μ g/mL por 48 horas. O pico de expressão de NOS ocorre em 12 horas após a indução, com o seu declínio ocorrendo após 72 horas (LIANG et al., 1999). Porém, quando analisamos o estímulo com a proteína purificada rPoly p 5, constatamos que esta proteína não eleva (comparativamente ao controle negativo) e nem inibe (comparativamente ao controle positivo) a produção de NO nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais.

Trabalhos anteriores relataram que o veneno bruto da abelha *Apis mellifera* possui efeito anti-inflamatório em macrófagos de linhagem RAW 267.4 e células de micróglia BV-2, pois age inibindo a via NF- κ B, interferindo assim na produção de óxido nítrico (JANG et al., 2005; HAN et al., 2007). O mesmo efeito foi observado com veneno bruto das vespas *Bracon hebetor* e *Vespa tropica* em linhagens RAW 267.4 e células BV-2, respectivamente (SABA et al., 2017; KAUSHIK et al., 2014). Já os

ensaios com o veneno bruto da vespa *Parachartergus fraternus* mostraram produção elevada de óxido nítrico no exsudato peritoneal de camundongos (MULLER et al., 2021). Tendo em conta que, conforme já referido inicialmente, o veneno de Hymenoptera é uma mistura muito complexa, a partir desses dados obtidos sobre a produção de NO, podemos inferir que o alérgeno Ag 5 de *P. paulista* não é uma peça chave para a sua produção ou inibição em células macrofágicas intraperitoneais de BALB/c. Estudos mais aprofundados com outros alérgenos majoritários ou com o veneno bruto de *P. paulista* devem ser conduzidos para que possamos verificar uma modulação mais proeminente na produção de NO, como relatado pelos trabalhos dos grupos de pesquisa citados acima.

A interação com o veneno induz a secreção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. No entanto, uma descrição detalhada da indução dessas citocinas por venenos de Hymenopteras ainda não está clara, principalmente em componentes isolados, como o caso do Ag 5, cuja função ainda é desconhecida.

As citocinas pró-inflamatórias elicitam manifestações inflamatórias locais e sistêmicas. Os efeitos locais incluem a ativação do endotélio vascular, aumento da permeabilidade vascular, acesso dos leucócitos ao tecido afetado e sua ativação e destruição local do tecido. As manifestações sistêmicas incluem febre, resposta de fase aguda e a possibilidade de evolução para choque anafilático. As análises de citocinas pró-inflamatórias nos sobrenadantes de macrófagos peritoneais estimulados com rPoly p 5, como descrito anteriormente, foram realizadas com um valor amostral de 44 camundongos. Os resultados nos mostraram que o rPoly p 5, quando em conjunto com LPS, diminui significativamente a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($p=0,0297$) e MCP-1 ($p=0,040$), comparado ao grupo controle positivo.

O TNF- α , que é produzido por macrófagos ativados, possui ação biológica multifuncional sobre as atividades das células-alvo, tanto imunes quanto não imunes (PARAMESWARAN, PATIAL, 2010). Esta citocina possui propriedade vasogênica, cuja qual propicia à infiltração de linfócitos, neutrófilos e monócitos. Também age no recrutamento de células para o local da inflamação, regulando assim a liberação de quimiocinas. O TNF- α , em conjunto com a IL-17, desencadeia a expressão de quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL5 que atraem neutrófilos e também pode aumentar a expressão de moléculas de adesão celular que facilitam a diapedese.

Apesar de ser considerada uma citocina relacionada à resposta tipo Th1, em conjunto com IL-6, influencia na diferenciação de linfócitos B e secreção de imunoglobulinas (GÓMEZ et al., 2004; PARAMESWARAN, PATIAL, 2010).

A MCP-1/CCL2 é um membro da família de citocinas que possui capacidade quimiotática para monócitos (DESHMANE et al., 2009). Essa quimiocina orchestra a migração desses tipos de células durante a defesa imunológica fisiológica e em circunstâncias patológicas, como doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide, doenças inflamatórias, doenças infecciosas, obesidade, diabetes e vários tipos de câncer. Evidências emergentes mostram que ela pode impactar o comportamento dos leucócitos, influenciando a adesão, polarização, secreção de moléculas efetoras, autofagia, morte e sobrevivência. A direção dessas respostas induzidas por CCL2 é dependente do contexto e, em alguns casos, sinérgica com outros estímulos inflamatórios (GSCHWANDTNER et al., 2019).

Nossos dados também demonstraram que o estímulo com rPoly p 5 eleva significativamente ($p=0,0409$) a produção da citocina inflamatória IL-1 β em culturas de macrófagos, *in vitro*, quando comparado com o grupo controle negativo (sem LPS). A análise de IL-1 β neste trabalho diverge de resultados preliminares (dados ainda não publicados pelo nosso grupo) encontrados em linhagens de macrófagos extraídos da medula óssea e células de linhagens tumorais (J774 e RAW 264.7), ambas tratadas com rPoly p 5. A citocina IL-1 β , assim como TNF- α , é um pirógeno que é produzido e liberado nos estágios iniciais da resposta imune. É produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (FERREIRO et al., 2006).

Verificamos também em nossas análises a tendência para o aumento das citocinas IL-6 e IL-10, quando as culturas de células foram tratadas somente com 1 $\mu\text{g/mL}$ de rPoly p 5, sem adição de LPS. Porém, os resultados encontrados não foram estatisticamente relevantes. A IL-6 pode ser secretada por macrófagos frente a estímulos como IL-1 β e TNF- α . Além de atuar na imunidade inata e adaptativa, vários trabalhos tem demonstrado que a IL-6 possui tanto efeito pró-inflamatório, quanto anti-inflamatório (GABAY et al., 1997). A IL-10 é uma das principais citocinas anti-inflamatórias, pois suprime diversas funções de células NK e impede o aumento da expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos e ativação de

linfócitos (MOORE et al., 2001). As demais citocinas analisadas, IL-1 α , IL-12p70, IL-17A, IL-27, IFN- β , IFN- γ , IL-23 e GM-CSF, não demonstraram alterações nos sobrenadantes de macrófagos quando comparados com as culturas dos grupos controle.

Com os resultados obtidos através dessas análises podemos inferir que o alérgeno rPoly p 5 modula positivamente a expressão de IL-1 β e inibe a produção das citocinas TNF- α e MCP-1 quando as culturas de células foram tratadas com LPS como estímulo inflamatório. Esta inibição na secreção de TNF- α e MCP-1 pode estar relacionada com um possível propriedade anti-inflamatória do alérgeno rPoly p 5.

O Ag5 já havia sido descrito como um possível modulador da resposta imune. Pesquisadores relataram em trabalhos anteriores que o antígeno 5 recombinante de *Vespula vulgaris* (Ves v 5), após aplicação intranasal em camundongos, evitou a sensibilização alérgica subsequente a todos os componentes do veneno da vespa, agindo assim como um imunossupressor, podendo ser utilizado para um tratamento profilático baseado na indução da tolerância da mucosa com alérgenos recombinantes (WINKLER et al., 2003).

Fernandes e colaboradores (2020) analisaram a produção de citocinas inflamatórias frente ao estímulo com o veneno bruto de *P. paulista* em culturas de esplenócitos extraídos de camundongos BALB/c. Os resultados obtidos demonstraram um aumento significativo na produção das citocinas IL-6 e IFN- γ , porém, não foi encontrada diferença na produção de IL-4, IL-1 β e TGF- β 1, quando comparada com o grupo controle. Além disso, foi relatado que a sensibilização de camundongos com um dos alérgenos majoritários de *Polybia paulista*, PLA1, expresso recombinantemente em bactéria, induziu um perfil Th1 / Treg no subconjunto de células T CD4⁺, sugerindo seu uso potencial em imunoterapia.

A indução de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* foi observada quando utilizado estímulo com veneno de várias espécies de Hymenopteras. Tavano e colaboradores (2011) investigaram a produção de citocinas nos sobrenadantes dos macrófagos humanos estimulados com o alérgeno apidaecina, uma proteína encontrada em *A. Mellifera*, muito semelhante ao Ag 5 encontrado no veneno de vespas (VAN VAEREMBERGH et al., 2013). Os macrófagos tratados com apidaecina aumentaram a liberação de citocinas e quimiocinas, tais como IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α e MCP-1. Porém, quando a apidaecina é testada em culturas de células macrofágicas

que foram estimuladas com LPS, há uma inibição de IL-6 e TNF- α . Mas, neste caso, não apenas macrófagos, mas também monócitos. Curiosamente, em baixas concentrações de apidaecina, o efeito inibitório parcial de LPS é predominantemente restrito à capacidade de estimular citocinas, enquanto, em concentrações mais elevadas, sua capacidade intrínseca de induzir estimulação de citocina aniquila os efeitos anti-LPS, ou seja, em altas concentrações a apidaecina possui efeito inflamatório e em baixas concentrações a apidaecina age como uma molécula anti-inflamatória (TAVANO et al., 2011).

Kaushik e colaboradores (2014) realizaram estudos para verificar os efeitos do veneno de *Vespa Tropica* na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e MCP-1 em células BV-2 tratadas com LPS. A exposição da célula BV-2 à LPS resultou em níveis elevados de TNF- α , IL-6 e MCP-1. Porém, os níveis reduziram significativamente após exposição das culturas à diferentes concentrações do veneno, sugerindo potente propriedade anti-inflamatória do veneno bruto de *V. Tropica*. Foi relatado um efeito similar utilizando o veneno da vespa *Bracon hebetor* em células RAW 264.7 tratadas com LPS, onde ocorreu uma diminuição das citocinas IL-1 β , IL-1 e TNF- α , verificando-se um efeito anti-inflamatório.

Pessoa e colaboradores (2016) relataram aumento na secreção das citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α , liberadas nos sobrenadantes da cultura de macrófagos expostos ao veneno da formiga *Neoponera villosa*. Lam e colaboradores (2010) demonstraram que o veneno de *A. mellifera* apresenta propriedades pró-inflamatórias, induzindo, *in vitro*, a liberação de citocina IL-1 por macrófagos através da ativação da via p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). Muller e colaboradores (2021) realizaram experimentos de PCR em tempo real para analisar a expressão relativa de genes envolvidos na inflamação, tais como TNF- α , IL-10 e IFN- γ , nas células peritoneais de camundongos, coletadas após injeção de veneno de *Parachartergus fraternus* na dose de 200 μ g/kg. Os resultados obtidos demonstraram aumento nas expressões dos genes das citocinas TNF- α e IFN- γ , sugerindo assim um efeito inflamatório.

Esses padrões pró-inflamatórios com o uso de venenos brutos podem ser explicados pela presença de algumas proteínas que sabidamente induzem macrófagos a produzir e liberar citocinas, tais como as proteínas de choque térmico

(HSPs), fosfolipases, esterases, serino-proteases e metaloproteinases (PESSOA et al., 2016).

trabalho foi analisado também a produção de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e MHCII por macrófagos peritoneais estimulados com rPoly p 5. Todas essas análises foram feitas em culturas de células F4/80⁺ e demonstraram que, na concentração de 1 µg/mL, o rPoly p 5 não altera a frequência de células positivas ou expressão de marcadores CD80, CD86 e MHCII, tanto no grupo positivo (LPS) quanto comparado com o grupo controle negativo. Os resultados encontrados diferem dos obtidos em abelhas *Apis mellifera*, onde se observou que em macrófagos estimulados *in vitro*, com a proteína apidaecina, ocorreu regulação positiva da expressão da molécula co-estimulatória CD80 e redução parcial da expressão das moléculas MHCII e CD86, quando induzidas por LPS (TAVANO et al., 2011).

Em nosso estudo, foi utilizado a administração intraperitoneal de tioglicolato 3% em camundongos BALB/c, para geração de populações de macrófagos extraídas, com rendimentos e propriedades diferentes. O tioglicolato é conhecido por ser irritante químico estéril e sua inoculação induz uma resposta inflamatória local aguda, acompanhada pela emigração local de células fagocíticas. Trabalhos relataram que a injeção de tioglicolato a 3% promove um aumento das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e principalmente de MHCII em macrófagos peritoneais de camundongos coletados após 4 dias. Esse aumento é visto até o sexto dia após o estímulo com tioglicolato (WU et al., 2004). Isso sugere que, após o estímulo, as células da linhagem monócito / macrófago se congregaram no peritônio e foram ativadas pelas citocinas produzidas pelos macrófagos. Esses macrófagos ativados internalizaram os grânulos de tioglicolato via fagocitose, pinocitose ou Fc. Após internalizar e processar o antígeno, os macrófagos começaram a expressar as moléculas relacionadas ao antígeno que se apresentavam em sua superfície (WU et al., 2004).

Como observado na **Figura 21**, os níveis de moléculas co-estimulatórias, expressas em macrófagos peritoneais, após a aplicação de LPS, não difere do seu nível sem estímulo (controle negativo), podendo-se deduzir que as moléculas CD80 e MHCII já estavam sendo expressas na superfície dos macrófagos antes da indução com rPoly p 5 e LPS, corroborando com os dados encontrados por Wu e colaboradores (2004).

A via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) é uma das vias inflamatórias clássicas que é ativada sempre que ocorre algum estresse celular. Essa via compreende uma série de componentes transcricionais do citoplasma e do núcleo, responsáveis pela indução da inflamação. A sinalização de NF- κ B se inicia com a estimulação de IRAK1, que fosforila TAK1 e atua sobre IKK α / β , presente na forma inativa no citoplasma. A fosforilação ativada de IKK α / β estimula a subunidade I κ B α de NF- κ B, deixando-a livre para translocar para o núcleo (VIATOUR et al., 2005).

Como demonstrado em nossos resultados, houve diminuição significativa ($p=0,0463$) de expressão de NF- κ B quando as culturas foram tratadas com rPoly 5, sem adição de LPS. Entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada em comparação com o grupo controle positivo, com ou sem estímulo de rPoly p 5. Uma das possíveis explicações para a diminuição significativa de NF- κ B, quando estimulado somente com rPoly p 5, pode ser relacionada ao fator tempo. Os macrófagos foram cultivados com estímulos durante 48 horas e depois coletados para análise de NF- κ B. Pode-se inferir que nesse tempo de coleta já não existam formas ativadas de NF- κ B no núcleo dos macrófagos, devido a rápida ação desse fator nuclear.

A ativação induzida por agonista da sinalização de TLR4, como por exemplo LPS, e translocação de NF- κ B em macrófagos primários é significativamente mais rápida do que em linhagens celulares imortalizadas. Bagaev e colaboradores (2019) relatam que a ativação pós-LPS da fosforilação de NF- κ B atinge o pico em 5 minutos, enquanto a degradação de I κ B α e a cinética de translocação nuclear de NF- κ B atingiu o pico em 10 minutos. A cinética de sinalização foi substancialmente mais rápida em comparação com a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7, onde a translocação nuclear de NF- κ B atingiu o pico 30 min após a estimulação com LPS.

Dentre os genes, cuja expressão é controlada pelo NF- κ B, os mais conhecidos são os genes codificadores do fator de crescimento GM-CSF; citocinas IL-1, 2, 6, 8, TNF- α , INF- α e β ; de fatores anti-apoptóticos, TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1, c-IAP2, dentre outros (WANG, et al., 1998; MCKAY & CIDLOWSKI, 1999). O NF- κ B também é um fator de transcrição chave para regular a expressão de iNOS (D'ACQUISTO et al., 1997), corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, onde a produção de óxido nítrico não foi alterada quando estimulada com rPoly p 5.

O NF- κ B pode ser ativado de várias maneiras, dentre as quais se destacam: citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1, fatores ativadores de linfócitos T e B, LPS bacteriano, proteínas virais, fatores de crescimento e fatores indutores de estresse (BROWN, et al., 1995; CARLSEN, et al., 2002). Sua inibição pode ser realizada de diversas maneiras, tais como as drogas anti-inflamatórias não esteroidais, os hormônios esteroides anti-inflamatórios, e toxinas (D'ACQUISTO et al., 2002).

Resultados obtidos com o veneno da vespa parasitária *Bracon hebetor* revelaram que o veneno bruto suprimiu, de forma dose dependente, a expressão de fosforilação de todos os componentes relacionados às vias clássicas de NF- κ B e MAPK em células RAW 264.7 (SABA et al., 2017). O mesmo foi relatado para o veneno de *A. mellifera* em células da mesma linhagem, onde foi observado uma diminuição nos níveis de mRNA de iNOS, COX-2 e NF- κ B. Esses resultados sugerem que os efeitos anti-inflamatórios do veneno podem ocorrer devido à inibição da expressão desses genes, possivelmente por meio da supressão de NF- κ B (JANG et al., 2005). Alinhando a esta ação inibitória de NF- κ B, o veneno de *N. vitripennis* amorteceu a expressão de IL-6, uma citocina pró-inflamatória prototípica, de macrófagos tratados com LPS. O veneno também inibiu a expressão de dois genes alvo de NF- κ B, I κ Ba e A20, que atuam em um loop de feedback negativo para prevenir a atividade excessiva de NF- κ B (DANNEELS et al., 2014).

Macrófagos M1 são caracterizados por possuírem níveis elevados na expressão de MHCII, CD80 e CD86, bem como elevada produção de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e MCP-1 (MILLS, 2015; NEVES, 2015). Todavia, a literatura sugere que há uma plasticidade entre os fenotipos M1 e M2, sendo que a depender do estímulo recebido pela célula pode ocorrer uma mudança do fenótipo funcional (LIU et al., 2013; MILLS, 2015). Perfis de macrófagos M2a/c apresentam alterações em algumas vias metabólicas, como no metabolismo de arginina, levando a produção de ornitina e poliamina em vez da produção de citrulina e NO. Macrófagos M2 também apresentam também baixa capacidade para promoverem a apresentação de antígenos (MOSSER, EDWARDS., 2008; SOLINAS et al., 2009). Enquanto os macrófagos M1 são considerados microbicidas e inflamatórios (patogênese pós-infecciosa), os macrófagos M2 são imunomoduladores (M2a e M2c) e fracamente microbicidas (MILLS et al., 2015). Os macrófagos M2 não constituem uma população

uniforme e frequentemente são subdivididos nas categorias M2a, M2b e M2c. O denominador comum de todas as três subpopulações é a alta produção de IL-10 acompanhada por baixa produção de IL-12. Uma de suas propriedades é a produção da enzima Arginase-1, que esgota a L-arginina, suprimindo assim as respostas dos linfócitos T e privando iNOS de seu substrato.

No presente estudo, os macrófagos que foram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos, após o estímulo de tioglicolato, possivelmente produziram perfil de macrófagos M1, pois, como citado anteriormente, o tioglicolato induz resposta inflamatória nas células fagocíticas. Após a obtenção das células, as mesmas foram incubadas *in vitro* e estimuladas com o rPoly p 5, e após 48 horas foram coletadas para os ensaios descritos nesse trabalho. Uma hipótese é de que, após o estímulo com o alérgeno rPoly p 5, ocorreu uma alteração na polaridade dos macrófagos, convertendo seu perfil de fenótipo M1 para M2a/c, devido a uma possível tendência ao aumento das citocinas IL-10, IL-6 e diminuição significativa das citocinas inflamatórias TNF- α ($p=0,0297$) e MCP-1 ($p=0,040$), que são conhecidas por estarem presentes no perfil M1. Outro indício da possível modulação do rPoly p 5 na polarização para o perfil M2 é o fato dos macrófagos não produzirem NO e nem expressão de moléculas co-estimulatórias, quando comparada ao grupo controle sem LPS.

7. Conclusão

A forma recombinante do alérgeno Ag5 de *Polybia paulista*, expressa em *K. phaffii* (rPoly p 5) se mostrou tóxica na dose de 2 µg/mL em células de linhagens macrofágicas J774 e RAW 264.7, sendo utilizado, para ensaios em macrófagos peritoneais de camundongos, a concentração de 1 µg/mL de rPoly p 5.

A partir dos dados obtidos da análise de óxido nítrico, podemos inferir que o alérgeno rPoly p 5 não altera sua produção em células macrofágicas intraperitoneais de BALB/c.

O rPoly p 5 atua como um modulador da resposta imunológica, inibindo a produção das citocinas TNF- α e MCP-1, quando estimulada com LPS e, induzindo a produção *in vitro* da citocina IL-1 β em macrófagos extraídos de camundongos BALB/c. As citocinas IL-6, IL-1 α , IL-12p70, IFN- γ , IFN- β , IL-27, IL-17a, IL-10 e GM-CSF não mostraram alterações frente ao alérgeno recombinante.

Foi demonstrado também que, na concentração de 1 µg/mL, o rPoly p 5 não modificou a frequência de células positivas ou expressão de marcadores CD80, CD86 e MHCII.

O rPoly p 5 diminuiu significativamente a produção *in vitro* da forma ativada p65 do fator de transcrição NF-kB em macrófagos, quando comparado ao grupo controle negativo (sem LPS).

A avaliação do potencial pró ou anti-inflamatório do alérgeno rPoly p 5, por meio da análise das respostas dos macrófagos intraperitoneais de camundongos, ainda não levou a uma compreensão clara do potencial imunomodulador desta proteína. Todavia, alguns achados podem indicar um papel importante deste alérgeno na polarização de fenótipos funcionais de macrófagos M2. Mais estudos precisariam ser efetuados para um melhor embasamento, principalmente estudos *in vivo*, para afirmar a função biológica e o perfil de macrófagos quando estimuladas com o alérgeno Ag5 de *Polybia paulista*.

8. Perspectivas futuras

Neste estudo relatamos um indício de que o rPoly p 5, em macrófagos intraperitoneais de camundongos, atua como imunomodulador e estaria polarizando uma mudança de fenótipo M1 para o perfil M2, com bases nas citocinas secretadas, moléculas co-estimulatórias e produção de NO. Estudos em paralelo estão sendo concluídos, utilizando outras linhagens de macrófagos, tais como monócitos extraídos da medula óssea e macrófagos de linhagens tumorais RAW 264.7 e J774. Os resultados desses outros dois estudos, além de embasar os resultados obtidos neste trabalho, poderão elucidar o real efeito do alérgeno rPoly p 5 na imunidade inata.

Experimentos futuros envolvendo análises de NF- κ B estimulados com rPoly p 5 coletados em diferentes tempos, bem como as de avaliação das cinéticas de citocinas, NO e moléculas co-estimulatórias em diferentes concentrações (doses menores) serão necessários para um melhor entendimento do efeito biológico do alérgeno Ag5.

Estudos *in silico* com o alérgeno Ag5 também seriam de fundamental importância para compreendermos a interação deste alérgeno com possíveis receptores alvos na membrana de macrófagos, permitindo assim determinar quais vias de sinalização inflamatória seriam ativadas.

Paralelamente, em um trabalho realizado por meio do programa BEPE-FAPESP (Proc. 2019/02298-3) em colaboração com o Laboratório de Alergologia Translacional e Molecular - *Institute of Allergy Research, Helmholtz Zentrum* – Munique, Alemanha, sob a supervisão do Dr. Simon Blank, pude obter o Ag5 de *Polybia paulista* expresso na forma recombinante em células de inseto *Spodoptera frugiperda*. Essa nova técnica de clonagem e expressão em *S. frugiperda* será, em breve, aplicada no laboratório de Imunologia Translacional da Unicamp, sob a supervisão do Dr. Ricardo de Lima Zollner e do Dr. Luis Gustavo Romani Fernandes, visando obter a aprovação do uso de rPoly p5 em CRD (*Component Resolved Diagnostics*), que implicará, futuramente, em um kit de diagnóstico com os principais componentes alérgicos de *Polybia paulista*.

Referências:

- 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, 2018.
- ABBAS, K. A., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia celular e Molecular*. 6ª ed. **Saunders**, Rio de Janeiro, 2012.
- ABRAM, D. M. et al. Cross-reactive carbohydrate determinant in *apis mellifera*, *solenopsis invicta* and *polybia paulista* venoms: Identification of allergic sensitization and cross-reactivity. **Toxins**, v. 12, n. 10, 2020.
- ABREU, M.R. “Avaliação morfofisiológica e imunológica in vitro dos efeitos dos extratos salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae).” Dissertação de Mestrado, 153p. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2017.
- AGUIAR, A.P., DEANS, A.R., ENGEL, M.S., FORSHAGE, M., HUBER, J.T., JENNINGS, J.T., JOHNSON, N.F., LELEJ, A.S., LONGINO, J.T., LOHRMANN, V. Order Hymenoptera. **Zootaxa** 3703, 51–62, 2013.
- AGUIAR, M. D. M. Estudo estrutural por RMN do peptídeo Policatiônico Polybine I de veneno da vespa *Polybia paulista*. 2006. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Exatas do Câmpus de São José do Rio Preto-SP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- ALEGRE, M. L., K. A. FRAUWIRTH, C. B. THOMPSON. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nat**, 2001.
- ALTMANN, F. The role of protein glycosylation in allergy. **Int Arch Allergy Immunol**. 142(2):99-115, 2007.
- ANTONICELLI, L.; BILO, M.B. BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera Allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, London, v.2, p.341-346, 2002.
- 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.
- BAGAEV, A. V. et al. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF-κB in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF-κB into the cell nucleus. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.
- BALDACCI, S.; OMENAAS, E.; ORYSZCZYN, M. P. Allergy markers in respiratory epidemiology. **European Respiratory Journal**, 2001.

BARNA, B. P. et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. **Journal of Neuroimmunology**, v. 50, n. 1, p. 101–107, 1994.

BAZON, M. L. et al. Current advances in immunological studies on the vespidae venom antigen 5: Therapeutic and prophylaxis to hypersensitivity responses. **Toxins**, v. 10, n. 8, 2018.

BAZON, M. L. et al. Heterologous expression, purification and immunoreactivity of the antigen 5 from *Polybia paulista* wasp venom. **Toxins**, v. 9, n. 9, 2017.

BEADLING, C.; SLIFKA, M.K. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, 54, 15-24, 2006.

BEUTLER, B.A. The role of tumor necrosis factor in health and disease. **J. Rheumatol Suppl**, 57:16–21, 1999.

BILÒ M.B. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. **Allergy**; 66 (Suppl. 95): 35–37, 2011.

BILÒ, B. M.; BONIFAZI, F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 8, p. 330–337, 2008.

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.

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.

BILÒ, M. B. et al. Self-medication of anaphylactic reactions due to Hymenoptera stings-an EAACI Task Force Consensus Statement. **Allergy**, v. 71, n. 7, p. 931–943, jul. 2016.

BILÒ, M. B.; OLLERT, M.; BLANK, S. The role of component-resolved diagnosis in Hymenoptera venom allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 19, n. 6, p. 614–622, 2019.

BLANK, S. et al. Antigen 5 Allergens of Hymenoptera Venoms and Their Role in Diagnosis and Therapy of Venom Allergy. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 20, n. 10, 2020.

BLANK, S.; BILÒ, M. B.; OLLERT, M. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: Important steps towards precision medicine. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 48, n. 4, p. 354–364, 2018.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99, 1987.

BOCHUD, P.Y.; CALANDRA, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. **BMJ**; 326:262-6, 2003.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; PAIK, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, 55:227-233, 1994.

BONIFAZI F, JUTEL M, BILO BM, BIRNBAUM J, MULLER U. Prevention and treatment of Hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. **Allergy**;60:1459-1470, 2005.

BORDON, K.C.F., WIEZEL, G.A., AMORIM, F.G., ARANTES, E.C. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** 21, 43, 2015.

BOYLAN, M. T.; CROCKARD, A. D.; MCDONNELL, G. V.; ARMSTRONG, M. A.; HAWKINS, S. A. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) expression in multiple sclerosis patients: clinical subtype specific variation in peripheral monocytes and B cells and lack of modulation by high dose methylprednisolone. **J. Neurol. Sci.**, v. 167, p. 79- 89, 1999.

BRONTE, V.; SERAFINI, P.; MAZZONI, A.; SEGAL, D.M.; ZANOVELLO, P. L-Arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. **Trends in Immunology**, 24:302–306, 2003.

BUGEON, L., R. E. HARGREAVES, T. CROMPTON, S. OUTRAM, A. RAHEMTULLA, A. C. PORTER, M. J. DALLMAN. Selective silencing of full-length CD80 but not IgV-CD80 leads to impaired clonal deletion of self-reactive T cells and altered regulation of immune responses. **Eur. J. Immunol.** 31: 118-127, 2001.

CARRENO, B. M.; M. COLLINS. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.** 20: 29-53, 2002.

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.

CRUVINEL, W.M et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.** Vol.50, n.4, pp.434-447. ISSN 0482-5004, 2010.

D'ACQUISTO, F.; MAY, M.J.; GHOSH, S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. **Mol Interv.** 2:22-35, 2002.

DANNEELS, E. L. et al. How the venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* exhibits anti-inflammatory properties on mammalian cell lines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–13, 2014.

DE GRAAF, D. C. et al. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 145–154, 2009.

DEMAIN JG, MINAEI AA, TRACY JM. Anaphylaxis and insect allergy. **Curr Opin. Allergy Clin. Immunology**, 2010.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–325, 2009.

DINARELLO, C.A. Historical insights into cytokines. **Eur J Immunol** 37(Suppl 1):S34–45, 2007.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, vol. 118, no. 2, pp. 503–508, 2000.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–12, 2014.

ELIEH ALI KOMI, D.; SHAFAGHAT, F.; ZWIENER, R.D. Immunology of Bee Venom. **Clin. Rev. Allergy Immunol.** 54, 386–396, 2018.

FEBBRAIO, M.A.; PEDERSEN, B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB J**, 16: 1335-1347, 2002.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F.M.; ELLIOTT, M.; KATSIKIS, P.; MAINI, R.N. TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. **Circ Shock**. 1994.

FERNANDES, L. s. G. R. et al. Functional profile of antigen specific CD4+ T Cells in the Immune response to phospholipase a1 allergen from *Polybia paulista* Venom. **Toxins**, v. 12, n. 6, p. 1–12, 2020.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O.H.; ANDERSEN, O.S.; GIRARDIN, S.E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1² generation. **Review. British Society for Immunology**, Clinical and Experimental Immunology 147: 227-235, 2006.

FIELDS, P. E.; FINCH, R. J.; GRAY, G. S.; ZOLLNER, R.; THOMAS, J. L.; STURMHOFEL, K.; LEE, K.; WOLF, S.; GAJEWSKI, T. F.; FITCH, F. W. B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells. **J. Immunol.**, v. 161, p. 5268-5275, 1998.

FIRESTEIN, G.S. IN CECIL TEXTBOOK OF MEDICINE, GOLDMAN L.; AUSIELLO, D. Eds.; **Saunders**: Philadelphia, pp. 227-233, 2004.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A. Hymenoptera Stings. Clinical Techniques in Small Animal Practice, v. 21, n. 4, p. 194–204, 2006.

FRANCISCO-CRUZ, A. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Not just another haematopoietic growth factor. **Medical Oncology**, v. 31, n. 1, 2014.

FRUCHT, D.M.; FUKAO, T.; BOGDAN, C.; SCHINDLER, H.; O'SHEA, J.J.; KOYASU, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol**, (10):556-60, 2001.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets: Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281–286, 2005.

GABAY, C.; SMITH, M.F.; EIDLEN, D.; AREND, W.P. Interleukin-1 receptor antagonist (IL- 1ra) is an acute-phase protein. **J Clin Invest**. 99: 2930-40, 1997.

GASSON, J.C. Molecular physiology of GM-CSF. **Blood**, 11, 1131–45, 1991.

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.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. Leishmania major amastigotas initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of Tumor Necrosis Factor- α . **The Journal of Immunology** 145: 4290-4207, 1990.

GREENFIELD, E. A.; NGUYEN, K. A.; KUCHROO, V.K. CD28/B7 costimulation: a review. **Crit. Rev. Immunol**. 18: 389-418, 1998.

GRIMALDI, D.A., AND ENGEL, M.S. Evolution of the Insects. **Cambridge University Press**, 2005.

GSCHWANDTNER, M.; DERLER, R.; MIDWOOD, K.S. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. **Front Immunol**, 13;10:2759, 2019.

HAMILTON, R. G. Diagnostic methods for insect sting allergy. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, 2004.

HAN, S. M. et al. Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor- α production stimulated by LPS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 176–181, 2007.

HATHCOCK, K. S. et al. Comparative analysis of b7-1 and b7-2 costimulatory ligands: Expression and function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 2, p. 631–640, 1994.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, 132: 344–362, 2008.

HERBERTH G, HERZOG T, HINZ D, RÖDER S, SCHILDE M, SACK U, DIEZ U, BORTE M, LEHMANN I. Renovation activities during pregnancy induce a Th2 shift in fetal but not in maternal immune system. **Int J Hyg Environ Health**. 3:309-16, 2013.

HOFFMAN, D. R. Allergens in Hymenoptera venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 92, n. 5, p. 707–716, 1993.

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

HURST, S.M.; WILKINSON, T.S.; MCLOUGHLIN, R.M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, 14(6):705–14, 2001.

HUYNH, K.K.; KAY, J.G.; STOW, J.L.; GRINSTEIN, S. Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. **Physiology** (Bethesda), 22:366–72, 2007.

INCORVAIA C, FRATI F, DELL'ALBANI I, ROBINO A, CATTANEO E, MAURO M, DAVID M, QUALIZZA R, PASTORELLO E. Safety of Hymenoptera venom immunotherapy: a systematic review. **Expert Opin Pharmacother**. 12(16):2527-32, 2011.

INCORVAIA, C.; MONTAGNI, M.; RIDOLO E. The efficiency of peptide immunotherapy for respiratory allergy. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, 9:6, 831-837, 2016. DOI: [10.1586/17512433.2016.1157017](https://doi.org/10.1586/17512433.2016.1157017)

JANG, H. S. et al. Effects of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW 264.7 macrophage cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 157–160, 2005.

JUSTO JACOMINI, D. L. et al. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v. 64, p. 70–80, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.019>>.

JUSTO JACOMINI, D. L. et al. Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom. **Toxicon**, v. 82, p. 104–111, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.016>>.

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 390, 2015.

KAMIJO, R.; HARADA, H.; MATSUYAMA, T.; BOSLAND, M.; GERECITANO, J.; SHAPIRO, D.; LE, J.; KOH, S. I.; KIMURA, T.; GREEN, S. J. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. **Science**, 263: 1612- 1615, 1994.

KAUSHIK, D. K. et al. *Vespa tropica* venom suppresses lipopolysaccharide-mediated secretion of pro-inflammatory cyto-chemokines by abrogating nuclear factor- κ B activation in microglia. **Inflammation Research**, v. 63, n. 8, p. 657–665, 2014.

KOBAYASHI K, YOSHIDA T. The Immunopathogenesis of Granulomatous Inflammation Induced by Mycobacterium tuberculosis. **Methods**. (2):204-14, 1996.

KRISHNA MT, EWAN PW, DIWAKAR L. Diagnosis and management of Hymenoptera venom allergy: British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI) guidelines. **Clin Exp Allergy**; 41(9):1201-20, 2011.

KRUMMEL, M. F.; J. P. ALLISON. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **J. Exp. Med**. 182: 459-465, 1995.

LAM, P.D.; MANDAL, P.K.; HAK, S.Y.; HWANG, S.G. Study of the molecular mechanism of anti-inflammatory activity of bee venom in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages. **Trop. J. Pharm. Res**. 10, 19–26, 2010.

LANG, T. J.; NGUYEN, P.; PEACH, R.; GAUSE, W. C.; VIA, C. S. In vivo CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function. **J. Immunol.**, v. 168, p. 3786-3792, 2002.

LI, Y. et al. Gene cloning, expression, and localization of antigen 5 in the life cycle of *Echinococcus granulosus*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2315–2323, 2012.

LIM, W., W. MA, K. GEE, S. AUCOIN, D. NANDAN, F. DIAZ-MITOMA, M. KOZLOWSKI, A. KUMAR. Distinct role of p38 and c-Jun N-terminal kinases in IL-10-dependent and IL-10-independent regulation of the costimulatory molecule B7.2 in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. **J. Immunol**. 168: 1759-1769, 2002.

LIM, W.; GEE, K.; MISHRA, S.; KUMAR, A. Regulation of B7.1 costimulatory molecule is mediated by the IFN regulatory factor-7 through the activation of JNK in lipopolysaccharide- stimulated human monocytic cells. **J. Immunol**. 175: 5690-5700, 2005.

LINDSTEIN, T., C. H. JUNE, J. A. LEDBETTER, G. STELLA, C. B. THOMPSON. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. **Science**, 244: 339-343, 1989.

LIU, L. P. et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of calreticulin gene in the ant *Polyrhachis vicina roger* (Hymenoptera: SsFormicidae). **Sociobiology**, v. 60, n. 4, p. 355–361, 2013.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S.C. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther**, 2:17023, 2017.

LOCHER, G.D.A., TOGNI, O.C., SILVEIRA, O.T., GIANNOTTI, E. The social wasp fauna of a Riparian forest in Southeastern Brazil (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology** 61, 225–233, 2014.

LU, G. et al. Sequence analysis and antigenic cross-reactivity of a venom allergen, antigen 5, from hornets, wasps, and yellow jackets. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 7, p. 2823–2830, 1993.

LU, J.; CAO, Q.; ZHENG D.; SUN, Y.; WANG, C.; YU, X. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. **Kidney Int.** 84(4):745–55, 2013.

MACCHIA, D. et al. *Vespa crabro* immunotherapy versus *Vespula*-venom immunotherapy in *Vespa crabro* allergy: A comparison study in field re-stings. **World Allergy Organization Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 2018.

MACMICKING, J. D.; NORTH, R. J.; LACOURSE, R.; MUDGETT, J. S.; SHAH, S. K.; tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci**, 94: 5243-5248, 1997.

MAGNELLI, P. E., BIELIK, A. M., GUTHRIE, E. P. Identification and Characterization of Protein Glycosylation using Specific Endo- and Exoglycosidases. **J. Vis. Exp.** (58), e3749, 2011.

MAINI, R.N.; ELLIOTT, M.J.; BRENNAN, F.M.; FELDMANN, M. Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol**, (2):207-12,1995.

McCANN, S.M.; LICINIO, J.; WONG, M.L.; YU, W.H.; KARANTH, S.; RETTORRI V. The nitric oxide hypothesis of aging. **Experimental Gerontology**, 33(7/8):813-826, 1998.

MCKAY, L.I.; CIDLOWSKI, J.A. Molecular control of immune/inflamamatory responses: interactions between nuclear factor-κB and steroid receptor- signaling pathways. **Endoc Rev.** 4:435-59, 1999.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 454: 428-35, 2008.

MERTENS M, AMLER S, MOERSCHBACHER BM. Cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the results of the basophil activation test in hymenoptera-venom allergy. **Clin Exp Allergy**; 40:1333– 1345, 2010.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, v. 586, n. 5, p. 585–595, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>>.

MILLS, C. D. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, p. 1–12, 2015.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.**;19:683–765, 2001.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology** 8, pp. 958-969, 2008.

- MULLER, J. A. I. et al. Pro-inflammatory response induced by the venom of *Parachartergus fraternus* wasp. **Toxicon**, v. 190, n. December 2020, p. 11–19, 2021.
- MÜLLER, U. et al. IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 67, n. 8, p. 1069–1073, 2012.
- MULLER, U. R. New developments in the diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 124, p. 447-53, 2001.
- MURRAY, P. J. et al. Experimental Guidelines. *Immunity.*, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2015.
- MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol** 11(11): 723-737, 2011.
- NEVES, E. M. dos S. F. T. "Macrófago: Biologia, Diversidade e Função", Dissertação de Mestrado. 2015. Disponível em: http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5175/1/PPG_23493.pdf.
- OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 1: a000034, 2009.
- PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853–6866, 1999.
- PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, 20(2):87-103, 2010.
- PEREZ-RIVEROL, A. et al. Wasp venom: Unravelling the toxins arsenal of *Polybia paulista* venom and its potential pharmaceutical applications. **Journal of Proteomics**, 2017.
- PESSOA, W. F. B. et al. Analysis of protein composition and bioactivity of *Neoponera villosa* venom (Hymenoptera: Formicidae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, 2016.
- PFEILSCHIFTER, J. et al. Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase—potential for a novel class of anti-inflammatory agents. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 1996.
- RAETZ, M.; HWANG, S.H.; WILHELM, C. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nat Immunol** 14, 136–142, 2013.
- 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.
- RINDSJO E, SCHEYNIUS A. Mechanisms of IgE-mediated allergy. **Exp Cell Res** 316(8):1384–9, 2010. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.038.

ROSSOL, M.; HEINE, H.; MEUSCH, U.; QUANDT, D.; KLEIN, C.; SWEET, M.J. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, 31:379–446, 2011.

SABA, E. et al. Anti-Inflammatory Activity of Crude Venom Isolated from Parasitoid Wasp, *Bracon hebetor* Say. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.

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

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.

SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti- inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**, 1813(5):878–88, 2011.

SCHIENER, M. et al. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 1, p. 98–108, 2017.

SCHRODER, K. P. J.; HERTZOG, T.; RAVASI, E. D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol** 75(2): 163- 189, 2004.

SCURO, L.S.; SIMIONI, P.; GRABRIEL, D. Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean flavonoids accumulated in response to nitroprusside and fungal elicitation. **BMC Biochem** 5, 5, 2004.

SENFTLEBEN, U.; CAO, Y.; XIAO, G.; GRETEN, F.R.; KRAHN, G.; BONIZZI, G. Activation by IKK alpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. **Science**, 293: 1495–1499, 2001.

SIMIONI, P. U., FERNANDES, L. G. R., TAMASHIRO, W. M. S. C. "Downregulation of L-arginine metabolism in dendritic cells induces tolerance to exogenous antigen", **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 44–57, 2017.

SIMIONI, P.U.; FERNANDES, L.G.R.; GABRIEL, D.L.; TAMASHIRO, W.M.S.C. Induction of Systemic Tolerance in Normal but not in Transgenic Mice Through Continuous Feeding of Ovalbumin. **Scandinavian Journal of Immunology**, 60: 257-266, 2004.

SIMS, J.E.; GIRI, J.G.; DOWER, S.K. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 action. **Clin Immunol Immunopathol**, 72: 9-14, 1994.

SKALNIK, D.G. Transcriptional mechanisms regulated myeloid-specific genes. **Gene**, 284:1-21, 2002.

SOLINAS, G.; GERMANO, G.; MONTOVANI, A. Tumor-associated macrophages (TAM) as major player of cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte biology**, 86, pp. 1065-1073, 2009.

SOLOMON, C. G.; CASALE, T. B.; BURKS, A. W. Hymenoptera-Sting Hypersensitivity. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 15, p. 1432–1439, 10 abr. 2014.

STANLEY, A.C.; LIEU, Z.Z.; WALL, A.A.; VENTURATO, J. KHROMYKH, T.; HAMILTON, N.A. Recycling endosome-dependent and -independent mechanisms for IL-10 secretion in LPS-activated macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, 2012.

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.
SUN, S.C.; CHANG, J.H.; JIN, J. Regulation of nuclear factor-kappaB in autoimmunity. **Trends Immunol**, 34: 282–289, 2013.

SUN, S.C.; LEY, S.C. New insights into NF-kappaB regulation and function. **Trends Immunol**, 29: 469–478, 2008.

SUN, S.C.; LIU, Z.G. A special issue on NF-kappaB signaling and function. **Cell Res**, 21:1–2, 2011.

TAKEDA, K. AND AKIRA, S. Toll receptors and pathogen resistance. **Cellular Microbiology**, 5: 143-153, 2003.

TANNO, L. K. et al. Mapping hypersensitivity/allergic diseases in the International Classification of Diseases (ICD)-11: cross-linking terms and unmet needs. **Clinical and Translational Allergy**, v. 5, n. 1, p. 20, 3 dez. 2015.

TAVANO, R. et al. The honeybee antimicrobial peptide apidaecin differentially immunomodulates human macrophages, monocytes and dendritic cells. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 6, p. 614–622, 2011.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 239–243, 2007.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu Rev Immunol**, 27:693–733, 2009.

VAN VAERENBERGH, M. et al. Extending the honey bee venom with the antimicrobial peptide apidaecin and a protein resembling wasp antigen 5. **Insect Molecular Biology**, v. 22, n. 2, p. 199–210, 2013.

VANDEN EIJNDEN, S., GORIELY, S., DE WIT, D., WILLEMS, F. AND GOLDMAN, M. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. **Eur. J. Immunol.**, 35: 469–475, 2005.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu Rev Immunol**, 10:411–52, 1992.

VIATOUR, P.; MERVILLE, M.P.; BOURS, V.; CHARLOT, A. Phosphorylation of NF-κB and IκB proteins: implications in cancer and inflammation, **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 30, no. 1, pp. 43–52, 2005.

VINZÓN, S. E. et al. Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a hypoallergenic antigen 5. **Protein Expression and Purification**, v. 73, n. 1, p. 23–30, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2010.03.029>>.

WANG, C.Y.; MAYO, M.W.; KORNELUK, R.G.; GOEDDEL, D.V.; BALDWIN, J.R. NFκB Antiapoptosis: induction of TRAF-1 and TRAF-2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. **Science**. 281:1680–3.

WANG, Y. C.; SASHIDHAMURTHY, R.; NAGARAJAN, S. S. B7-1 HAS (CD80- CD24) a recombinant hybrid costimulatory molecule retains ligand and costimulatory functions. **Imm Lett**, 2006.

WINKLER, B. et al. Allergen-specific immunosuppression by mucosal treatment with recombinant Ves v 5, a major allergen of *Vespula vulgaris* venom, in a murine model of wasp venom allergy. **Immunology**, v. 110, n. 3, p. 376–385, 2003.

WOLVERTON, W.; BEAKES, D. E.; HUEBNER, S. Hymenoptera Venom Hypersensitivity Evaluation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. AB26, fev. 2013.

WU, Q. et al. Kinetics of the phenotype and function of murine peritoneal macrophages following acute inflammation. **Cellular & molecular immunology**, v. 1, n. 1, p. 57–62, 2004.

XIANG, J.; GU, X.; QIAN, S.; CHEN, Z. Graded function of CD80 and CD86 in initiation of T-cell immune response and cardiac allograft survival. **Transpl. Int.**, v. 21, p. 163-168, 2008.

XIAO, W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology** 1, 425–433, 2004.

YOKOI, H.; YOSHITAKE, H.; MATSUMOTO, Y.; KAWADA, M.; TAKATO, Y.; SHINAGAWA, K. Involvement of cross-reactive carbohydrate determinants-specific IgE in pollen allergy testing. **Asia Pac Allergy**. 7(1):29-36, 2017.

YOON, W.J.; HAM, Y.M.; KIM, S.S.; YOO, B.S.; MOON, J.Y.; BAIK, J.S.; LEE, N.H.; HYUN, C.G. Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. **EurAsia J BioSci** 3, 17, 130-143, 2009.

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

ZHANG, H.; SUN, S.C. NF- κ B in inflammation and renal diseases. **Cell Biosci**, 5: 63, 2015.

ZHANG, W.; LIU, H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, vol. 12, no. 1, pp. 9–18, 2002.

ZHANG, W.; XU, W.; XIONG S. Blockade of Notch1 signaling alleviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization. **J Immunol**. 184(11):6465–78, 2010.

ANEXOS



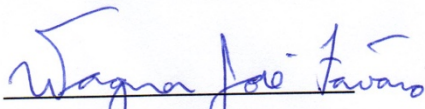
CERTIFICADO

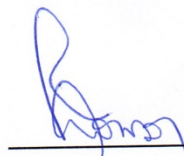
Certificamos que a proposta intitulada Avaliação biológica e inflamatória dos efeitos do Antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) na forma recombinante, sobre células de linhagem macrofágica, registrada com o nº 4845-1/2018, sob a responsabilidade de Dr. Luis Gustavo Romani Fernandes e Murilo Luiz Bazon, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 07 de maio de 2018.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	26/04/2018-01/05/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	07/05/2018-01/05/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/c AnUnib
No. de animais:	40
Idade/Peso:	04 semanas / 20g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Laboratório de Imunologia Translacional, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 07 de maio de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Favaro
Coordenador


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.