UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

EFEITOS DO ALÉRGENO rPoly p 5 DO VENENO DE *P. paulista* (HYMENOPTERA, VESPIDAE) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

ISABELA OLIVEIRA SANDRINI ASSUGENI

Rio Claro – SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

Efeitos do alérgeno rPoly p 5 do veneno de *P. paulista* (Hymenoptera, Vespidae) sobre a resposta inflamatória em macrófagos diferenciados de células da medula óssea

ISABELA OLIVEIRA SANDRINI ASSUGENI

Orientadora: Profª. Drª. Márcia Regina Brochetto-Braga
Co-orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo Romani Fernandes

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

Rio Claro – SP
2021

A851e

Assugeni, Isabela Oliveira Sandrini

Efeitos do alérgeno rPoly p 5 do veneno de P. paulista (Hymmenoptera, Vespidae) sobre a resposta inflamatória em macrófagos diferenciados de células da medula óssea / Isabela Oliveira Sandrini Assugeni. -- Rio Claro, 2021

73 p. : il., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Márcia Regina Brochetto-Braga

Coorientadora: Luis Gustavo Romani Fernandes

1. Hymenoptera. 2. Antígeno 5. 3. Macrófagos. 4. Imunomodulação. 5. Alergia. 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.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DO ALÉRGENO rPoly p 5 DO VENENO DE P. paulista (HYMENOPTERA, VESPIDAE) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

AUTORA: ISABELA OLIVEIRA SANDRINI ASSUGENI
ORIENTADORA: MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA
COORIENTADOR: LUIS GUSTAVO ROMANI FERNANDES

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

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

Profa. Dra. PATRICIA UCELLI SIMIONI (Participaçao Virtual)
Faculdade de Americana / FAM

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

Rio Claro, 05 de agosto de 2021

Dedico este trabalho às minhas famílias. Aos meus pais de sangue, Rogério Assugeni e Márcia Oliveira e à minha irmã Larissa Assugeni. Aos meus pais de coração, Sebastião e Suseli Bazon, e ao meu companheiro Murilo Bazon.

Por serem a minha força.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Estadual Paulista - UNESP, em especial o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) que me proporcionou a oportunidade desse mestrado.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2017/18422-0, pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta dissertação. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Técnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado com o número de preocesso 130987/2019-0. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora Drª. Márcia Regina Brochetto Braga, por ter me acolhido como sua aluna, pela oportunidade de entrar na vida de pesquisadora, pelos conselhos, inúmeras explicações e ensinamentos, pela paciência, elogios e críticas, e pela excelente orientação, e por mostrar a importância do trabalho conjunto.

Ao meu co-orientador Dr. Luis Gustavo Romani Fernandes, pelos longos dias de ensino no laboratório, por transmitir seu conhecimento com muita paciência, compreensão, atenção, e pelo seu tempo dedicado a mim.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Translacional, da UNICAMP, que me recebeu de braços abertos para realizar este trabalho. Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, ao Prof. Dr. Luís Gustavo Romani Fernandes que cederam espaço do laboratório e material para a minha pesquisa, sempre muito atenciosos e dedicados comigo, e à Patrícia Janino, pelas conversas e risadas do dia a dia e por sempre ajudar quando pode, da maneira que pode.

A todos os que fazem e os que fizeram parte da minha vida acadêmica e engrandeceram minha formação científica. Passar por esse processo foi uma experiência engrandecedora para minha formação profissional e humana, e levarei os aprendizados conquistados para a vida. Agradeço em especial ao Murilo Bazon por ter me ajudado e ensinado do início ao fim dessa pesquisa e pela companhia em diversos experimentos, à Camila Pansa pelas conversas e conselhos, que consegue sempre ver o lado positivo das coisas e sempre torce por mim, e ao Lucas Machado, pelas conversas de laboratório e de vida.

Aos colegas de mestrado e aos professores da pós-graduação que proporcionaram grandes aprendizados na minha vida.

Aos amigos da Gangue do Marrocos, que apesar da distância sempre serão a minha família de vida e coração. Agradeço à Carol, à Mayara, à Jaque, à Raquel, ao Felipe e ao João. Aos amigos da graduação, Julia, Geovana, Lara e Felipe.

Às minhas irmãs de coração, Clara e Ana, pelos 21 anos de amizade, por estarmos juntas nos momentos mais importantes das nossas vidas, por sempre me apoiarem, aconselharem e sempre desejar o melhor para mim como eu quero para vocês. Obrigada pela nossa amizade única, indestrutível, e pela confiança que temos entre nós.

Agradeço mais uma vez ao Murilo por ter escolhido compartilhar a vida comigo, pela parceria nessa fase de pós-graduação, pelo companheirismo, pelas conversas, abraços, planejamentos, conselhos, carinho, amor, por fazer tudo por mim e sempre me fazer mais feliz. Obrigada por me dar uma família incrível como a sua pra fazer parte. Agradeço ao Sebastião e à Suseli Bazon, por todo o amor, carinho, mimos e felicidade de sempre. À vó Izaltina pelas risadas. À Aline e Fernando, por terem proporcionado a alegria que é ter a Cecília na minha vida. Amo vocês!

À minha família, que me tornou quem eu sou hoje. Agradeço imensamente os meus pais, Rogério e Márcia, por me ensinarem as coisas mais valiosas da vida, por estarem

sempre comigo, por sempre me apoiarem e motivarem, por todo amor, cuidado, carinho, e energia positiva que me mandam todos os dias, e que apesar de todas as dificuldades sempre me proporcionaram o melhor de tudo. À minha irmã, minha maior companheira, que me entende e conhece melhor que qualquer um nessa vida. Temos uma conexão que sempre nos surpreende, sempre sabemos quando uma precisa da outra e a gente sempre se ajuda, muito obrigada por tudo! Pai, mãe, Lari, vocês me ajudaram passar por essa jornada e se um dia eu puder retribuir tudo o que fizeram por mim eu estarei realizada! Amo vocês!

A todos os meus familiares que estiveram presentes e me ajudaram a concluir essa etapa. Ao meu avô, Domingos (em memória), pelo orgulho que sei que sentiria de mim. Aos meus tios Andréa e Ricardo, e às minhas primas Camila, Milena, Mirela e Rafaela pela alegria dos nossos encontros. Um agradecimento especial à minha vóinha Ângela e minha tia Raquel, que sempre me deram abrigo, amor, carinho e motivação quando precisei. Amo vocês!

À Jolie, Noa Flor, Zezé, Bob, Nina, Babi, Filó, Madonna, Lina e Nino. Pelo amor puro que vocês proporcionam. Vocês são luz, e sempre estarão em meu coração.

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

Muito obrigada a todos!

me levanto
sobre o sacrifício
de um milhão de mulheres que vieram antes
e penso
o que é que eu faço
para tornar essa montanha mais alta
para que as mulheres que vierem depois de mim
possam ver além

- legado

Rupi Kaur

RESUMO

Polybia paulista (Hymenoptera, Vespidae) é uma vespa social abundante no sul e sudeste brasileiro, bem como em outros países como Argentina e Paraguai. Esta espécie faz parte das muitas espécies de insetos da ordem Hymenoptera de importância médica. Há um elevado risco de acidentes com ferroadas, sendo que, dependo da quantidade de veneno e do grau de sensibilização do indivíduo, estes acidentes podem acarretar reações alérgicas sistêmicas com chance de evoluírem para o choque anafilático. Estudos com os alérgenos componentes 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. Todavia, são necessários estudos para esclarecer o papel biológico e funcional deste antígeno no contexto das reações de hipersensibilidade ao veneno. Assim, neste trabalho avaliamos o potencial efeito imunomodulador do alérgeno Antígeno 5 de *P. paulista,* expresso na forma recombinante (rPoly p 5) em levedura *Komagataella phaffi*, sobre macrófagos diferenciados de células precursoras, presentes na medula óssea de camundongos (BM-M), ativados e não ativados com estímulos pró-inflamatórios. Para isto foram analisadas, nestas células, alterações de viabilidade celular, capacidade fagocítica, produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas pró-inflamatórias, além da expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86. Os resultados obtidos, indicam que rPoly p 5 não afeta significativamente a produção de NO em BM-M ativados ou não com estímulos pró-inflamatórios. Todavia, provocou redução na frequência de células expressando as moléculas coestimuladoras CD86 e CD80 em BM-M ativados e não ativados com estímulos pró-inflamatórios, respectivamente. Adicionalmente, rPoly p 5 induziu ao aumento de IL-

23 e IL-27 em BM-M não ativados e de GM-CSF em BM-M ativados, além de redução de MCP-1 em BM-M ativados. Estes achados podem indicar um papel importante deste alérgeno na polarização de fenótipos funcionais de macrófagos em diferentes estímulos, ativados e não ativados. Neste sentido, a partir das análises das respostas de BM-M quanto ao potencial pró ou anti-inflamatório do rPoly p 5, conclui-se que os resultados aqui obtidos poderão auxiliar na compreensão do potencial imunomodulador dessa proteína na imunidade inata.

Palavras-chave: Hymenoptera, Polybia paulista, antígeno 5, macrófagos, imunomodulação.

ABSTRACT

Polybia paulista (Hymenoptera, Vespidae) is a social wasp abundant in south and southeastern Brazilian regions, as well as in other countries such as Argentina and Paraguay. This species belongs to a large group of insects from the Hymenoptera order of medical importance. There is high risk of accidents with stings, and, depending on the amount of venom and the degree of individual's sensitization, these accidents can lead to systemic allergic reactions, with chance of evolving to anaphylactic shock. Studies with this venom's allergens have gained increasing interest due to the promising results of its use in laboratorial diagnosis, as well as in clinical protocols of allergen-specific immunotherapy. Among the components of *P. paulista* venom, the protein antigen 5 (Poly p 5) has been considered one of the main allergens present in this species. However, studies are needed to enlighten the biological and functional role of this antigen in the context of hypersensitivity reactions to the venom. Thus, in this work we evaluated the potential pro or anti-inflammatory effect of the allergen antigen 5 of *P. paulista*, expressed in recombinant form (rPoly p 5) in yeast *Komagataella phaffi*, on macrophages differentiated from precursor cells present in mouse bone marrow (BM-M), activated and not activated with pro-inflammatory stimuli. For this purpose, changes in cell viability, phagocytic capacity, production of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines were analyzed in these cells, in addition to the expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86. The results obtained indicate that rPoly p 5 does not significantly affect NO production in BM-M activated or not with pro-inflammatory stimuli. However, it caused a reduction in the frequency of cells expressing the co-stimulatory molecules CD86 and CD80 in activated and non-activated BM-M with pro-inflammatory stimuli, respectively. In addition, rPoly p 5 induced an increase in the expression of IL-23 and IL-27 in non-activated BM-M, and

of GM-CSF in activated BM-M, and reduced the expression of MCP-1 in activated BM-M. These findings may indicate an important role of this allergen in the polarization of functional macrophages phenotypes under different stimuli, activated and non-activated. In this sense, from the analysis of BM-M responses regarding rPoly p 5 pro or anti-inflammatory potential, it can be concluded that the results obtained here may help understand this protein’s immunomodulatory potential in important components of innate immunity.

Key words: Hymenoptera, Polybia paulista, antigen 5, macrophages, immunomodulatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Filogenia do grupo Aculeata (insetos com ferrão) 15
Figura 2. A vespa social *Polybia paulista* 16
Figura 3. Modelo 3-D do alérgeno nPoly p 5 18
Figura 4. Esquema de ativação e polarização de macrófagos do tipo M1 e M2 20
Figura 5. Esquema ilustrativo da purificação de proteínas com o Sistema de Purificação de Proteínas Ni^{+2}-NTA-agarose 28
Figura 6. Placa de petri com colônias de levedura contendo o inserto poly p 5 35
Figura 7. SDS-PAGE a 12% de amostras da expressão de rPoly p 5 em *Komagataella phaffi* 28ºC por 72 horas 36
Figura 8. SDS-PAGE a 12% das alíquotas eluídas da coluna His-Trap Ni^{+2} de cromatografia de afinidade 37
Figura 9. Viabilidade celular de cultura de linhagens macrofágicas RAW 264.7 e J744 38
Figura 10. Efeito do rPoly p 5 na produção de óxido nítrico por BM-M 41
Figura 11. Expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, e MHC-II em BM-M 43
Figura 12. Efeito do rPoly p 5 na atividade fagocítica de BM-M 47
Figura 13. Efeito do rPoly p 5 na produção de citocinas em BM-M 49

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD – 7-amino-actinomicina-D

Ag5 – Antígeno 5

BMGY – Buffered methanol-complex medium

BM-M – Macrófagos diferenciados de células precursoras presentes na medula óssea

BMMY – Buffered glycerol-complex medium

BV-2 – Linhagem celular murina de células da micróglia

CAP – Superfamília de proteínas

CRD – Diagnóstico por componente resolvido

CCDs – Carboidratos determinantes de reatividade cruzada

CD – Grupo de diferenciação

CRISP – Proteínas secretoras ricas em resíduos de cisteínas

DII - Doença inflamatória intestinal

DMEM – Dulbecco's modified eagle's medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

EBI3 – Epstein-Barr-virus-induced gene 3

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

F4/80 – Marcador de superfície de macrófagos murinos

FCSB – Tampão de marcação para citometria

GM-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócito/macrófago

Hyal – Hialuronidase

IFN – Intérferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

iNOS – Isoforma indusível da sintase de óxido nítrico

IκB – Complexo de quinases Iκ

L929 - Linhagem celular murina de fibroblastos

LPS – Lipopolissacarídeo

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos

M1 – Macrófagos classicamente ativados

M2 – Macrófagos alternativamente ativados

MCP-1/CCL2 – Proteína-1 quimioatraente de monócitos

MFI – Média da incidência de fluorescência

MHC-II – Complexo de histocompatibilidade principal de classe II

NF-κB – Fator nuclear de ativação kappa B

NO – Óxido nítrico/nitrito

nPoly p 5 – Antígeno 5 nativo do veneno de *Polybia paulista*

PBS – Tampão salina-fosfato

PES – Polietersulfona

PLA1 – Fosfolipase A 1

Poly p 1 – Fosfolipase A 1 do veneno de *Polybia paulista*

Poly p 2 – Hialuronidase do veneno de *Polybia paulista*

Poly p 5 – Antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista*

Poly s 5 – Antígeno 5 do veneno de *Polybia scutellaris*

PPRs – Receptores de reconhecimento de padrões

PS – Fosfatidilserina

rPoly p 5 – Antígeno 5 do veneno de *P. paulista*, na forma recombinante

SDS-PAGE – Eletroforese denaturante em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SPF – Condições livres de patógenos comuns

TGF – Fator transformador de crescimento

Th2 – Linfócitos T helper tipo 2

TNF – Fator de necrose tumoral

Ves v 5 – Antígeno 5 do veneno de *Vespula vulgaris*

VIT – Imunoterapia com alérgeno específico de veneno

YNB – Yeast nitrogen base medium

YPD – Yeast extract peptone dextrose

SUMÁRIO

1. Introdução 15
2. Hipótese 25
3. Objetivos 26
3.1 Objetivos específicos 26
4. Material e Métodos 27
4.1 Expressão de poly p 5 – pPICZαA em Komagataella phaffii 27
4.2 Purificação e dosagem proteica de rPoly p 5 28
4.3 Animais 29
4.4 Diferenciação de macrófagos a partir de células precursoras da medula óssea 30
4.5 Obtenção de sobrenadante de células L929 30
4.6 Coleta e cultura de células da medula óssea 31
4.7 Avaliação da viabilidade celular 31
4.8 Avaliação da expressão de moléculas coestimuladoras 33
4.9 Avaliação da atividade fagocítica 34
4.10 Determinação da concentração de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura 34
4.11 Quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura 35
4.12 Análise estatística 35
5. Resultados e Discussão 36
5.1 Obtenção do alérgeno rPoly p 5 36
5.2 Efeito do rPoly p 5 na viabilidade celular 39
5.3 Efeito do rPoly p 5 na produção de óxido nítrico por BM-M 41
5.4 Efeito do rPoly p 5 na expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 e de MHC-II em BM-M 43
5.5 Efeito do rPoly p 5 na atividade fagocítica de BM-M 47

5.6 Efeito do rPoly p 5 na produção de citocinas em BM-M.....49
6. Conclusões.....60
7. Considerações finais 62
8. Referências.....63

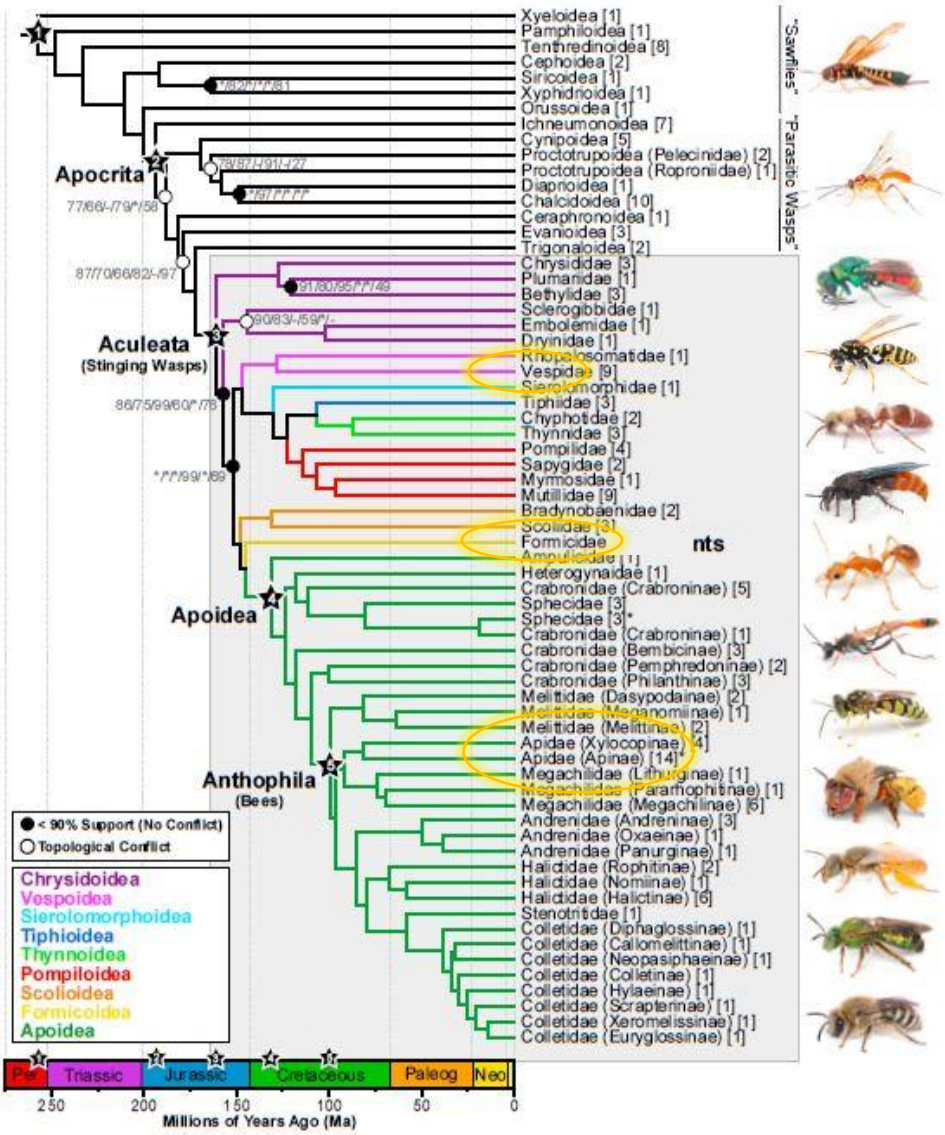
1. Introdução

Os insetos da ordem Hymenoptera (subordem Apocrita, grupo Aculeata) são os principais causadores de manifestação alérgica grave nos humanos. Esta ordem é o maior grupo de insetos, comportando mais de 146.000 de espécies descritas, sendo que só na Europa, pelo menos 50% das espécies presentes em coleções ainda não foram descritas. Acredita-se que essa porcentagem é muito maior no resto no mundo (AGUIAR, et al., 2013).

Pertencem a esta ordem as abelhas (Apidae), as vespas (Vespidae) e as formigas (Formicidae) (PETERS et al., 2017, SCHIENER et al., 2017). Esses três grupos de insetos (**Figura 1**) injetam veneno como mecanismo de defesa ou em suas presas por meio de órgãos originários de ovipositores que foram evolutivamente modificados em seus abdomens, e passaram a ser chamados de ferrões (ARIF, WILLIAMS, 2020, EVANS, ELSTON, 2020, ABREU, 2017). A ferroada desses insetos é a maior causa de respostas alérgicas sistêmicas na população devido à coabitação constante no ambiente urbano, sendo responsável por mais de 10 milhões de ferroadas em humanos e por 1,5% a 34,1% dos casos de choque anafilático que ocorrem mundialmente ao ano (BILÒ, 2011, DEMAIN, 2021, NEEDLEMAN et al., 2018). Esta grande variação em porcentagem se deve tanto à inconsistência de dados coletados, bem como à proximidade, ou não, dos insetos (e seus ninhos) com as populações humanas.

Os himenópteros causadores de reações alérgicas imediatas variam conforme a região do mundo (KOROŠEC et al., 2019), e dados estatísticos dos acidentes com himenópteros são incertos, pois muitas pessoas atingidas apresentam reações locais leves e não relatam a ocorrência (LEE et al., 2016). O contato com estes insetos são comuns, mas tais eventos podem levar a reações sistêmicas grandes com risco de morte (GOLDEN, 2017). Muitos fatores atuam na variabilidade ampla de dados, como a falta de um consenso universal para a definição de anafilaxia e perfis da população (BILÒ, 2011). Esses dados, juntamente ao fato de que 20% de todos os casos fatais de anafilaxia se constituem como resultado de acidentes com ferroada de insetos (BILÒ, 2011), monstram a sua importância médica no mundo, e principalmente nas regiões tropicais como a América Latina (PEREZ-RIVEROL et al., 2017).

Figura 1 - Filogenia do grupo Aculeata (insetos com ferrão). Imagem ilustra a extrema diversidade dos insetos deste grupo de elevada importância médica no mundo todo abrangendo as famílias Vespidae, Formicidae e Apidae.



Fonte: BRANSTETTER et al., 2017

Dentre as três famílias mencionadas, as vespas são o grupo mais agressivo e, por não possuírem o ferrão farpado, não o perdem durante a ferroada, tendo a capacidade de ferroar mais de uma vez (ARIF, WILLIAMS, 2020, TRZCINSKA et al., 2013). As vespas sociais, particularmente, coabitam com humanos e apresentam uma notável diversidade de espécies já identificadas no Brasil, demonstrando a importância médica mencionada anteriormente (PEREZ-RIVEROL et al., 2017). A

espécie de vespa *Polybia paulista* (**Figura 2**) é uma das 320 espécies de vespas sociais do Brasil, estando presente principalmente no sudeste brasileiro e também no Paraguai e no norte da Argentina. Nessas regiões, esta vespa é de grande importância médica, devido à sua extrema agressividade e por ter desenvolvido hábitos urbanos em decorrência da destruição de seu habitat natural (AGUIAR, 2006).

Figura 2 – **A vespa social *Polybia paulista*. A** Ilustração de um inseto da espécie *Polybia paulista*. **B** Representação de um ninho de insetos desta espécie. **C** Distribuição da vespa social *P. paulista* na América do Sul.

A

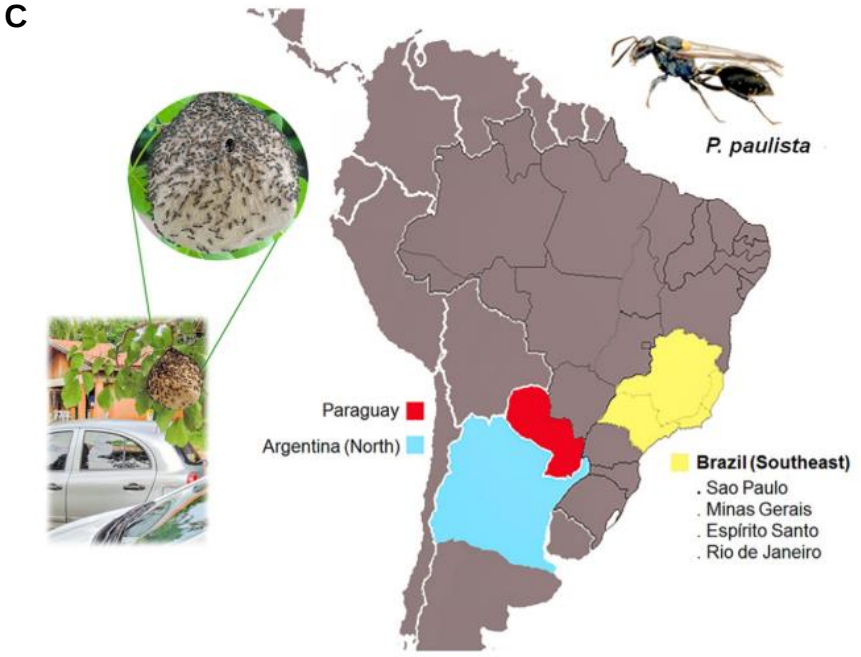


Fonte: Prof. Dr. Mario Palma/ UNESP

B



C



Fonte: PEREZ-RIVEROL et al., 2017

O veneno dos insetos Aculeata (com ferrão) é um composto altamente heterogêneo, apresentando proteínas secretadas, algumas das quais, com conhecida atividade enzimática, peptídeos, histamina, acetilcolina, catecolamina, e várias outras

substâncias (HOFFMAN, 2006). Em uma ferroada, a quantidade de proteínas injetada com o veneno varia de acordo com cada espécie, sendo que nas vespas essa quantidade pode ser de 4,2 a 17µg, dependendo do gênero, papel social dentro do ninho e tamanho da glândula de veneno. Os componentes de baixa massa molecular, como no caso dos peptídeos e aminas vasoativas, são responsáveis por reações inflamatórias locais, enquanto os de alta massa molecular, principalmente as proteínas, atuam como alérgenos e são responsáveis por reações sistêmicas. Um ou mais componentes mencionados acima podem causar reações de hipersensibilidade a um indivíduo (ARIF, WILLIAMS, 2020; TRZCINSKA et al., 2013).

Em geral, os sintomas clássicos que esses alérgenos causam são reações inflamatórias locais e sistêmicas, como dor, edema e vermelhidão, podendo em casos mais críticos, evoluir para choque anafilático. As vespas, incluindo a *P. paulista*, também apresentam seu veneno como misturas complexas de aminas biogênicas, peptídeos e proteínas de elevada massa molecular sintetizados como moléculas precursoras. Dentre essas últimas, as mais abundantes são os alérgenos hialuronidase (Hyal), fosfolipase A 1 (PLA1) e antígeno 5 (Ag5) (JUSTO JACOMINI et al., 2014), que possuem a capacidade de induzir o sistema imune a produzir anticorpos com alta especificidade, e desencadear reações alérgicas em pessoas sensibilizadas (AALBERSE, 2000).

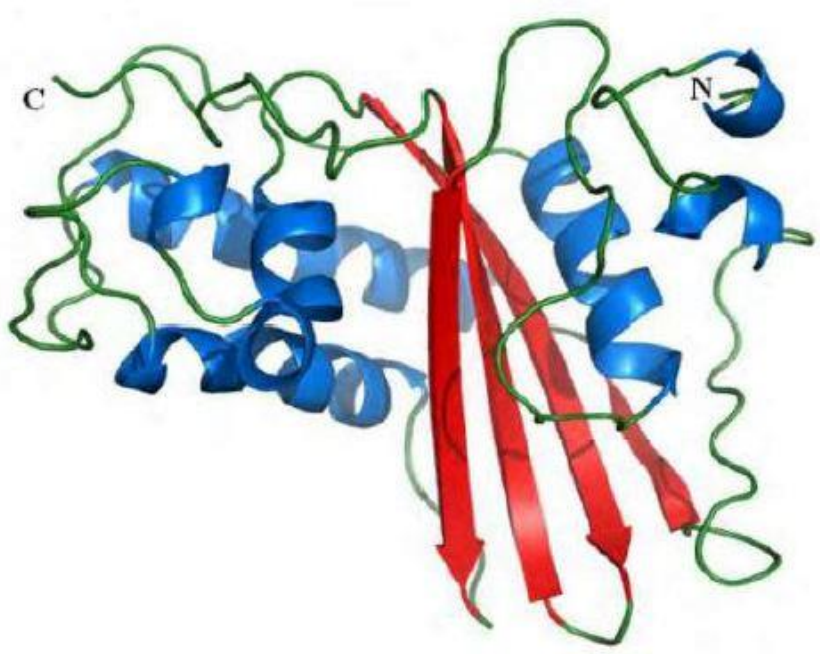
Dentre os três principais alérgenos supracitados, presentes no veneno de *P. paulista*, a Hyal (Poly p 2) e a PLA1 (Poly p 1) já foram caracterizadas e tiveram suas funções determinadas (PEREZ-RIVEROL et al., 2017, JUSTO JACOMINI et al., 2014). O Ag5 (Poly p 5), por sua vez, apesar de ainda não possuir função biológica conhecida (KING, SPANGFORT, 2000), tem sido considerado o composto mais alergênico do veneno de vespas (NAKAJIMA et al., 1985). Este alérgeno (**Figura 3**) apresenta massa molecular de 23 kDa, e pertence a um clado de proteínas secretoras ricas em resíduos de cisteínas (CRISP), a superfamília CAP (BILÒ, 2011). Em diversos estudos fica evidenciada a importância das proteínas dessa família, as quais, estão envolvidas em diferentes funções biológicas, tais como as funções reprodutiva e imunológica e a participação no controle e desenvolvimento de diversas doenças.

De acordo com Dos Santos-Pinto et al. (2014), por meio de análises proteômicas deste alérgeno, em sua forma natural (nPoly p 5), foram identificadas 6 isoformas, sendo a de maior peso molecular considerada a isoforma intacta e completa e as outras 5 (de menor peso molecular) podem ter surgido pela proteólise

controlada da proteína ou por regulação gênica (*splicing*). Apesar de não ser conhecida a exata função desse mecanismo, o autor indica que a produção de diferentes isoformas de uma mesma proteína aumenta a diversidade do proteoma do veneno de *P. paulista*.

Além disso, o Ag5 possui homologia elevada com diversos compostos biológicos, por exemplo, com proteínas encontradas em diversos tecidos, como em testículos de mamíferos, em folhas de plantas de tomate e tabaco, e em tumor no cérebro humano (GIBBS et al., 2008). No veneno de vespas o antígeno 5 é o componente mais alergênico, e fontes recentes indicam que esta proteína pode representar uma nova forma de imunoterapia para pacientes sensibilizados a veneno de Hymenoptera (BLANK et al., 2020).

Figura 3 – Modelo 3-D do alérgeno nPoly p 5. Modelo tridimensional da molécula nativa antígeno 5, um dos alérgenos mais abundantes no veneno de *Polybia paulista*.



Fonte: DOS SANTOS-PINTO et al., 2014

Sendo os alérgenos naturais extremamente difíceis de serem obtidos, devido às suas ínfimas quantidades no veneno *in natura*, a expressão recombinante dessas proteínas pode servir como uma fonte alternativa para a obtenção dos mesmos,

apresentando uma série de vantagens com relação ao tempo de obtenção, quantidade e principalmente por não depender da coleta direta de espécimes.

No caso de Poly p 5, quando expresso em levedura *P. pastoris*, há produtividade alta da proteína de interesse, em contraste com a produção baixa de proteínas intrínsecas desta levedura. O crescimento rápido e em densidade celular alta, existência de linhagens recombinantes mais estáveis, secreção mais eficiente e realização de processamento pós-traducional, representam grandes vantagens para a obtenção do alérgeno de forma muito semelhante ao nativo, quando comparados com a expressão em sistemas procariotos (DEMAIN, VAISHNAV, 2009).

Além disso, o fato de que, assim como o alérgeno natural, o Ag5 recombinante do veneno de *P. paulista* - rPoly p 5 - não apresenta carboidratos determinantes de reatividade cruzada (CCDs) quando expresso de forma heteróloga (BLANK et al., 2013, PEREZ-RIVEROL et al., 2018), implica em mais uma vantagem, uma vez que, devido a inexistência de CCDs, o risco de resposta falso-positiva em análises moleculares é muito remoto. Diversos estudos provaram que o alérgeno antígeno 5 recombinante mantém sua alergenicidade com eficácia (BAZON et al., 2019, MONSALVE et al., 2012; SELB, 2015; VOS et al., 2013), e puderam ser utilizados com sucesso para diagnóstico por componente resolvido (CRD) melhorado em pacientes sensibilizados a venenos de Hymenoptera (MONSALVE et al., 2012; SELB, 2015; VOS et al., 2013).

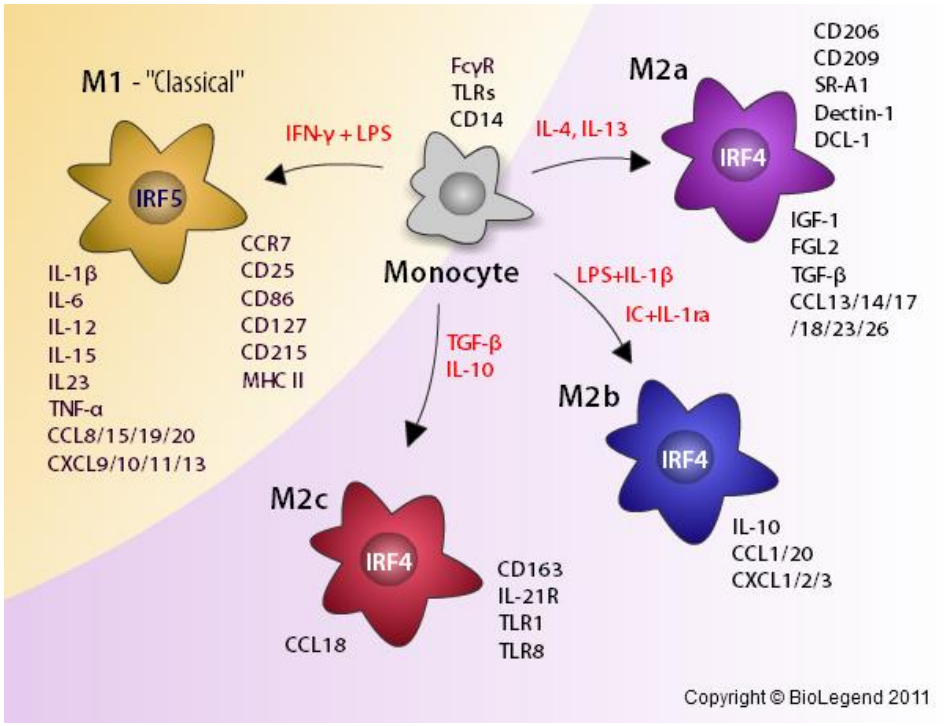
Em geral, os venenos de vespas levam à reação de hipersensibilidade tipo I, cuja resposta é dependente de IgE. A hipersensibilidade do tipo I é uma resposta imediata, caracterizada por uma reação antígeno-anticorpo, tendo como consequência alterações teciduais e vasculares (DE GRAAF et al., 2009, DEMAIN, VAISHNAV, 2009). Tal reação é caracterizada pela indução da produção de citocinas IL-4 e IL-5, produzidas por linfócitos Th2, as quais estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos específicos para os antígenos da classe IgE (JUSTO JACOMINI et al., 2013, SPILLNER et al., 2014). Entretanto, nas fases mais tardias das reações de hipersensibilidade destacam-se o papel de outras células imunes que potencializam a resposta e consequentemente o quadro inflamatório, que é o caso das células de imunidade inata, como os macrófagos (LOU et al., 2019).

Os macrófagos, por sua vez, desempenham papel fundamental na resposta imune com funções críticas para respostas fisiológicas e patológicas do hospedeiro,

como: fagocitose de microrganismos, materiais derivados do hospedeiro, detritos celulares e células apoptóticas para digestão; reconhecimento de sinais de perigo por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs); apresentação de antígenos para células imunes adaptativas; e a produção de mediadores inflamatórios que são críticos para a resposta imune do hospedeiro e para o reparo de danos teciduais locais (NARDO et al., 2016).

Macrófagos são considerados um dos primeiros leucócitos em um sítio de infecção ou inflamação, sendo uma característica marcante destas células a sua plasticidade funcional, podendo migrar de um fenótipo para outro, processo pelo qual montam uma resposta específica a depender dos estímulos recebidos. Sendo assim, os macrófagos se adaptam dependendo do microambiente local (BASHIR et al., 2016), podendo se diferenciar em tipos distintos (**Figura 4**): macrófagos classicamente ativados, denominados M1, com atividades antimicrobianas e citotóxicas, e macrófagos ativados alternativamente, chamados de M2 (LIU et al., 2013, MURRAY et al., 2014). Macrófagos M2 podem ainda ser classificados como M2a, M2b e M2c, dependendo do estímulo indutor de polarização (LOU et al., 2019).

Figura 4 – Esquema de ativação e polarização de macrófagos do tipo M1 e M2.



A resposta dos macrófagos é determinada tanto pelo tipo de ativação como pelas condições microambientais específicas nas quais as células foram diferenciadas antes de sua ativação. Macrófagos do tipo M1, que são classicamente ativados, são regulados positivamente pela molécula coestimuladora CD80, cuja expressão pode ser induzida pela ação de citocinas inflamatórias, como a TNF-α e INF-γ (AMBARUS et al., 2012, PARISI, 2014). Além disso, já foi mostrado por Kigerl et al. (2009), que o nível de CD86 também aumenta nas células M1 após ferimento. Assim sendo, ambas as moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 podem ser consideradas marcadores clássicos de polarização de M1 (BENOIT et al., 2008, KIGERL et al., 2009, PARISI, 2014).

Macrófagos do tipo M2 possuem potente capacidade fagocítica e promovem reparo tecidual (CHINETTI-GBAGUIDI et al., 2015), sendo que citocinas e quimiocinas produzidas por estas células podem favorecer a diferenciação de populações Th2 e o recrutamento de eosinófilos em infiltrados inflamatórios (LOU et al., 2019). Macrófagos M2a são polarizados pelas citocinas IL-4 e IL-13, enquanto M2b são induzidos por complexos imunes combinados com IL-1β ou LPS e marcados por alta expressão de IL-10 e baixa expressão de IL-12. Por sua vez, macrófagos M2c são polarizados por IL-10 e TGF-β e marcados por arginase I e CD206 (MMR) (CHINETTI-GBAGUIDI et al., 2015, MANTOVANI et al., 2002).

A isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) é capaz de produzir oxido nítrico (NO) a partir do metabolismo da L-arginina (BARRETO et al., 2005, DAVIS et al., 2013) em macrófagos M1 (CECILIO, 2011, MACMICKING et al., 1997, MONCADA, HIGGS, 2006). O gene que codifica a enzima iNOS é controlado pelo fator de transcrição NF-κB, o qual desempenha um papel fundamental em respostas celulares inflamatórias e imunológicas (PAHL, 1999). O complexo de transcrição do NF-κB está presente no citoplasma, ligado a proteínas inibitórias denominadas IκB, que o mantêm na forma inativa. A ativação inapropriada do NF-κB está associada a doenças inflamatórias e neoplasias, sendo esse um potencial alvo terapêutico (ZINGARELLI et al., 2003). Macrófagos M1 produzem NO em elevada concentração auxiliando a resposta inflamatória por ser um potente vasodilatador. Macrófagos M2, por outro lado, são caracterizados por produzir baixa quantidade de NO, em contraste com elevada atividade da enzima arginase I, a qual induz, em geral, cicatrização e proliferação da célula por meio de formação da ornitina (BASHIR et al., 2016).

Passar por uma reação anafilática pode ser um processo muito traumático, e, em muitos casos, a qualidade de vida após esse evento é prejudicada (BILÓ et al., 2005). Trzcinska et al. (2013) afirmam que a anafilaxia é uma reação que requer pronto diagnóstico e tratamento de emergência, porém 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 de vespa e formiga.

Hoje, o único tratamento eficaz existente para alergia ao veneno de Hymenoptera é a imunoterapia com alérgenos específicos do veneno (VIT), apresentando tanto segurança para o paciente como eficácia na prevenção de reações alérgicas sistêmicas (BLANK et al., 2020). No entanto, a sua eficácia depende da identificação correta do inseto responsável pela inoculação do veneno, para dar seguimento com o veneno do inseto correto para o tratamento (BLANK et al., 2020, GOLDEN, 2017). O histórico da ferroada pode fornecer informações importantes nesta identificação, como as estações do ano, localização geográfica do paciente e local onde ocorreu a ferroada. Por exemplo, acidentes com abelhas tendem a ocorrer mais na primavera e no verão e com vespas ocorrem mais no final do verão e no outono. A vespa Yellow Jacket geralmente é encontrada próximo ao lixo ou à comida. As abelhas Bumble (*Bombus* sp.) são caracteristicamente grandes, lentas e emitem zumbido alto (LEE et al., 2016). Esse tipo de informação pode ser fundamental na hora de realizar o diagnóstico e tratamento do paciente.

A VIT requer seleção de pacientes de maneira muito cuidadosa, sendo geralmente recomendada para os que apresentam reações graves de anafilaxia e que apresentaram resultados positivos para testes de IgE específico, e para pacientes com fatores de risco individuais que podem prejudicar a sua qualidade de vida, como doenças, uso de medicação concomitante e ansiedade (BILÒ, 2011, GOLDEN, 2017). Esta terapia se baseia na administração, geralmente por injeções subcutâneas, de doses crescentes do veneno do inseto responsável pela reação de hipersensibilidade no paciente. A administração da imunoterapia na sua fase de indução é realizada semanalmente, e na sua fase de manutenção é realizada a cada 30 dias, gerando tolerância imunológica (LUDMAN et al., 2015). A recomendação do período de tratamento varia de acordo com o paciente, geralmente levando de 3 a 5 anos, ou até períodos mais curtos se os testes de níveis de IgE se tornarem normais novamente.

Para alguns pacientes, no entanto, a VIT é recomentada para o resto da vida (BILÒ, 2011, GOLDEN et al., 2017).

A imunoterapia se dá por meio de mecanismos imunológicos complexos. Basicamente, primeiro ocorre a desensibilização de mastócitos e basófilos. Em seguida ocorrem alterações nos linfócitos T, como a formação de linfócitos T reguladores ao alérgeno. Finalmente, ocorrem alterações nos linfócitos B, respostas de eosinófilos ao alérgeno e aumento inicial de níveis de IgE seguido de redução ao longo de vários meses (EWAN, 2001). Golden (2017) indica a eficácia de 85% a 95% na prevenção de reações de hipersensibilidade sistêmicas em pacientes após a VIT com veneno de vespas.

A avaliação do perfil de resposta imune desencadeada por alérgenos específicos, como no caso do rPoly p 5, pode ser extremamente relevante na compreensão do potencial imunomodulador desta proteína.

Desta forma, o presente estudo visou avaliar se a proteína Poly p 5 atua como um modulador da resposta *in vitro* de macrófagos diferenciados de precursores da medula óssea, alterando o perfil de produção de óxido nítrico e de citocinas nestas células, além de influenciar na expressão de moléculas coestimuladoras e na sua capacidade fagocítica. Para isto, a proteína rPoly p 5 tem sido utilizada como modelo de estudo, a qual corresponde ao alérgeno Poly p 5 do veneno de *P. paulista*, expresso na forma recombinante em levedura *Komagataella phaffii*, e que até o momento apresentou propriedades imunológicas similares ao alérgeno nativo (nPoly p 5) (BAZON et al., 2017).

Neste sentido, o conhecimento aprofundado da resposta dos macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea de camundongos, frente ao estímulo com rPoly p 5, pode auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos imunológicos desencadeados por este alérgeno nas respostas de hipersensibilidade à ferroada da vespa *P. paulista*.

2. Hipótese

O alérgeno recombinante rPoly p 5, expresso em *Komagataella phaffii* e correspondente ao alérgeno nativo nPoly p 5 do veneno de *P. paulista* (Hymenoptera, Vespidae) modula a resposta *in vitro* de macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea de camundongos.

3. Objetivos

O presente estudo avaliou os efeitos do alérgeno recombinante rPoly p 5, expresso em *Komagataella phaffii* e correspondente ao alérgeno nativo nPoly p 5 do veneno de *P. paulista* (Hymenoptera, Vespidae) sobre a viabilidade, atividade fagocítica, expressão de moléculas coestimuladoras e produção de citocinas relacionadas com a resposta inflamatória, em macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea de camundongos da linhagem BALB/c.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar, em culturas de macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea, estimulados *in vitro* com a proteína rPoly p 5, os seguintes aspectos:

- Alterações de viabilidade em culturas de macrófagos (J774 e RAW 264.7)
- Níveis de produção de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura
- Alterações na atividade fagocítica de BM-M
- Níveis de expressão das citocinas IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, CCL2(MCP-1), IFN-β, IFN-γ, TNF-α, e GM-CSF nos sobrenadantes de culturas
- Perfil de produção de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e MHC-II por BM-M, por meio de citometria de fluxo

4. Material e Métodos

4.1 Expressão de poly p 5 – pPICZαA em Komagataella phaffii

O alérgeno rPoly p 5 foi expresso, com uma cauda de histidina (6x His) em seu N-terminal, em levedura *Komagataella phaffii* por meio de metodologia preestabelecida e indicada a seguir, no Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes-LBMA do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, Campus de Rio Claro, SP, Brasil.

Para a expressão heteróloga da proteína, as células de *K. phaffii* X-33/pPICZαA-*poly p 5* foram crescidas em meio YPD-agar Yeast Extract peptone Dextrose – (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, dextrose (glicose) a 2%, agar a 2% e Zeocina a 100µg/mL) a 28 ºC, durante a noite. Cada colônia isolada da placa foi inoculada em um frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 25mL do meio BMGY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, tampão fosfato de potássio pH 6,0 a 100 mM, YNB a 1.34%, biotina a $4x10^{-5}$ %, glicerol a 1%). Estes são denominados de pré-inóculos do processo de expressão e foram incubados à temperatura de 28ºC com agitação de 250 rpm, durante a noite. Na manhã seguinte, as suspensões de células foram submetidas a leitura em espectrofotômetro e calculado o volume de pré-inóculo necessário para ser utilizado no inócuo de 100mL com DO_{600nm} final de 1,0. As células deste volume foram centrifugadas a 3.000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células lavadas com 25 mL de H_2O estéril. Esse processo de lavagem foi repetido por mais 2 vezes. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 100 mL do meio BMMY (mesmo meio descrito acima, apenas substituindo-se o glicerol por 1,0 % de metanol) e transferidas para 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 foi adicionado o indutor - metanol - a uma concentração final de 1%, a cada 24 horas, durante 3 dias (T72), incubando a cultura a 28ºC, 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 pPICZαA vazio. No tempo de 72h após a indução, as culturas foram transferidas para tubos Falcon de 50mL, submetidas ao processo de centrifugação a 3000xg, 10 minutos,

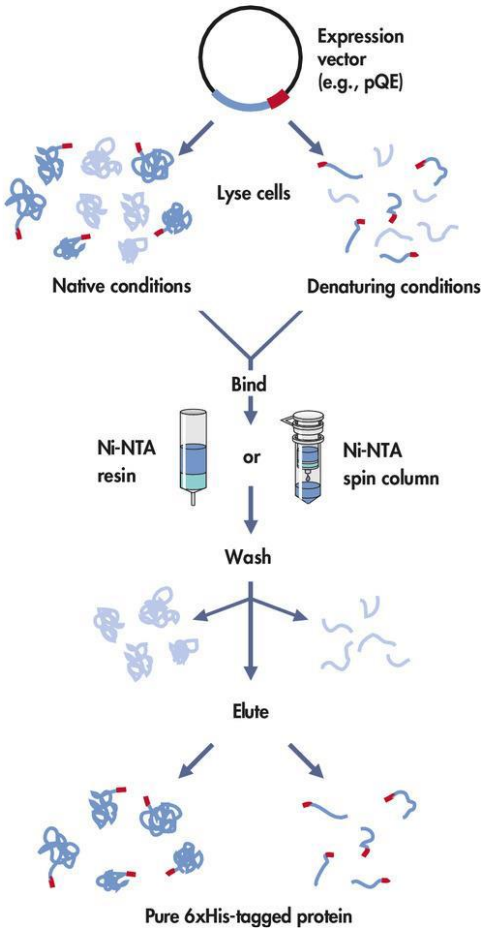
temperatura ambiente, tendo seus sobrenadantes recolhidos para análise da expressão em SDS-PAGE 12% e purificação da proteína expressa.

4.2 Purificação e dosagem proteica de rPoly p 5

Primeiramente, o rPoly p 5 passou por filtrações sequenciais em membranas (47 mm de diâmetro) de filtração polietersulfona (PES) de poro de 0,45 µm, seguida pela membrana PES de poro 0,22 µm, para a retirada dos resíduos celulares. Posteriormente, utilizando filtros Amicon (Ultra-15 Centrifugal Filter Units) de 10 kDa, a amostra foi concentrada e ressuspensas em 10 mL de tampão fosfato de sódio 20mM (Na/PO_4, pH 7,4), contendo 0,5 M NaCl e 20mM de imidazol. Em seguida, foi realizada purificação em coluna HisTrap™HP de 5 mL por cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} (Ni-NTA-Agarose) seguindo o protocolo do fabricante (Protocol 14, The QIAexpressionist, Qiagen, Germany), em que foram utilizados os seguintes tampões, todos a pH 7,4: (i) Tampão de lavagem I (50 mM Na/PO_4, 300 mM de NaCl e 20 mM de Imidazol); (ii) Tampão de lavagem II (50 mM Na/PO_4, 300 mM de NaCl e 50 mM de Imidazol); (iii) 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, as frações eluidas desta coluna foram analisadas por SDS-PAGE 12%.

Neste procedimento de purificação (**Figura 5**), a molécula de Ni^{+2} acoplada à resina da coluna interage especificamente com as moléculas de Histidina presentes na cauda da proteína recombinante expressa. Por outro lado, a mistura de proteínas e outras moléculas presentes na amostra somente interagem de forma inespecífica com a resina, podendo ser facilmente retiradas da coluna por sucessivas lavagens com tampões contendo diferentes concentrações de Imidazol, o qual, devido a sua semelhança de estrutura com a Histidina, se liga da mesma forma ao átomo de Ni^{+2} e, portanto, compete com as moléculas de Histidina pela ligação com a resina. Desta forma, o tampão com a maior concentração de Imidazol capaz de deslocar o alérgeno recombinante rPoly p 5 que havia ficado preso à resina da coluna é o de 75mM, conforme observado por Bazon et al. (2017).

Figura 5 - **Esquema ilustrativo da purificação de proteínas com o Sistema de Purificação de Proteínas Ni^{+2}-NTA-agarose.**



Fonte: GE Healthcare LifeSciences

Após a purificação por cromatografia de afinidade, foi realizada a troca do tampão das amostras de rPoly p 5 por tampão salina-fosfato (PBS 1X) utilizando filtros Amicon Pro Affinity (Ultra-0.5 Concentration Kit) de 3 kDa. A amostra purificada em tampão PBS 1X foi quantificada pela reação de Bradford (BRADFORD, 1976) e leitura de DO_{450nm} conforme protocolo do fabricante (Sigma), utilizando albumina bovina como padrão.

4.3 Animais

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 idade. Os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos comuns (SPF), 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) com certificado de aprovação de n°5289-1/2019.

4.4 Diferenciação de macrófagos a partir de células precursoras da medula óssea

Os macrófagos foram diferenciados a partir da estimulação das células precursoras da medula óssea em meio de cultivo celular condicionado, contendo fatores de crescimento estimuladores de colônia (CSF) produzidos por células de linhagem de fibroblastos murinos L929, de acordo com o protocolo de Boltz-Nitulescu et al. (1987), com algumas modificações.

4.5 Obtenção de sobrenadante de células L929

Fibroblastos de camundongos da linhagem L929 (ATCC), criopreservados no Laboratório de Imunologia Translacional, foram descongelados em meio DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), contendo 10% de soro fetal Bovino (SFB) (Vitrocell, Campinas-SP, BR) acrescido dos antibióticos, 5 µg/mL de 10U/mL de penicilina, 10µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), e do antifúngico Anfotericina B (Thermo Fisher Scientific). As células foram semeadas em frasco de cultura tipo T75 (Corning, NY, USA) e cultivadas a 37ºC, em estufa com atmosfera de 5% de CO_2. Os sobrenadantes das culturas foram coletados cerca de 48 horas após o início das culturas, na fase de crescimento logarítmico, centrifugados a 400xg, por 5 min, filtrados em unidades filtrantes com membranas de poro 20µm (Millex, Merck-Millipore, MA, USA) e estocados a -20ºC até o momento do uso, para diferenciação de células da medula óssea.

4.6 Coleta e cultura de células da medula óssea

As células precursoras foram coletadas dos fêmures e tíbias dos camundongos injetando-se cerca de 1mL de tampão salina-fosfato (PBS) acrescido de 10U/mL de penicilina, 10µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), no interior das peças cortadas nas duas extremidades. Após centrifugação a 400xg por 5 minutos, a suspensão de células da medula foi ajustada para a concentração de 2 x 10^6 células/mL em meio de cultura DMEM (Gibco) completo, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell) acrescido dos antibióticos e antifúngico acima descritos. Para os ensaios de diferenciação das células, foram semeadas 2x10^6 células/poço em placas de cultura de seis poços (Corning) em 3mL de meio DMEM completo, contendo 30% do sobrenadante de células L929 (meio condicionado) e incubadas por sete dias a 37ºC em estufa com atmosfera de 5% de CO_2. A cada três dias, foram realizadas as trocas do meio condicionado por meio novo. Após o período de diferenciação os macrófagos já diferenciados a partir de precursores da medula óssea (BM-M) foram retirados das placas por lavagens com PBS contendo 10mM de EDTA (Sigma) a 4°C.

A suspensão celular obtida foi ajustada para a concentração de 2x10^6 células/mL sendo semeadas a uma densidade de 2x10^5 células/poço em placas de 96 poços, e 1x10^6 células/poço em placas de 12 poços. O volume total utilizado para placas de 96 poços foi de 200 µL de meio DMEM/poço e para placas de 12 poços foi de 1mL de meio DMEM/poço, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e os estímulos: IFN-γ (50UI/mL, Peprotech, Rocky Hill, NJ) e LPS (0,5µg/mL, *Escherichia coli*, O111: B4, Sigma). A concentração de rPoly p 5 utilizada nos ensaios descritos abaixo foi de 1µg/mL. As culturas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e 90% de umidade. Após a incubação, alíquotas dessas células em cultura foram coletadas para avaliação da viabilidade, expressão de moléculas coestimuladoras e atividade fagocítica por citometria de fluxo, conforme descrito a seguir. Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para ensaio de detecção de NO e citocinas (SIMIONI et al., 2017).

4.7 Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade e dos mecanismos de morte celular foram realizadas através da marcação das células utilizando o kit *Fitc Annexin V apoptosis detection*

Kit, with 7-Aminoactinomycin D (7AAD) (Biolegend, San Diego, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A anexina usada neste kit 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 excluirão 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.

Possíveis danos celulares induzidos pelo alérgeno rPoly p 5 em linhagem de células tumorais RAW 264.7 e J774 foram investigados. Estas linhagens tumorais foram utilizadas pelo motivo de que elas são mais resistentes e suportam mais situações críticas do que macrófagos obtidos *in vivo*, principalmente macrófagos jovens diferenciados diretamente de células obtidas da medula óssea de camundongos. Além disso, a obtenção de células diretamente de um animal geralmente é baixa quando comparado com a quantidade de células que podem ser obtidas em cultura de linhagens, e foi dada preferência de realizar o sacrifício de animais para realizar os demais ensaios.

As linhagens de células J774 e RAW 264.7 foram cedidas pela Prof. Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro (IB-UNICAMP) e utilizadas para avaliar a viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de rPoly p 5. As células foram cultivadas em meio DMEM (Vitrocell, Campinas-SP, BR) suplementado com soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, Campinas-SP, BR) a 10%, a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e 90% de umidade, até semi-confluência. Em seguida, estas células foram colhidas, lavadas com o mesmo meio sem SFB, e a sua concentração ajustada a $2x10^6$ células/mL com meio completo. A suspensão de células de linhagem J774 e RAW 264.7 foram semeadas a uma densidade de $1x10^6$ células/poço em placas de 12 poços num volume de 500µL/poço. Em seguida, foram acrescidos 500µL de meio DMEM/cavidade, contendo 10% de SFB contendo as concentrações de: 0,1µg/mL; 0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1µg/mL e 2µg/mL de rPoly p 5. As culturas foram incubadas a

37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e 90% de umidade por 48 horas. Após esse período as células foram extraídas das placas por lavagens com PBS contendo 10mM de EDTA (Sigma) a 4°C.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Millipore) e as análises foram feitas com programa computacional 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+).

4.8 Avaliação da expressão de moléculas coestimuladoras

Para avaliar a expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 nos macrófagos diferenciados da medula óssea foram realizados ensaios de citometria de fluxo, conforme descrito previamente (SIMIONI et al., 2017), com algumas modificações. Brevemente, a marcação das células foi realizada utilizando anticorpos específicos, conjugados a fluorocromos para os marcadores de superfície anti-mouse F4/80 e anti-mouse MHC-II (Biolegend) para a marcação da população de macrófagos diferenciados e os anticorpos anti-mouse CD80, anti-mouse CD86 (Biolegend) para uso em citometria de fluxo, seguindo as recomendações dos fabricantes. Os anticorpos foram diluídos em tampão específico – tampão de marcação para citometria FCSB (PBS contendo soro fetal bovino 5% e azida sódica 0,09%). Em seguida, as amostras contendo os anticorpos foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos e após este período foram realizadas duas lavagens com FCSB, seguidas de centrifugação a 400xg por 5 minutos, sendo as células posteriormente fixadas em PBS contendo 1% formaldeído (Merck-Millipore).

Em todas as amostras, houve a marcação com a sonda de viabilidade Zombie NIR™ *Fixable viability kit* (Biolegend) permitindo que todas as análises realizadas tivessem sido 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. A expressão dos marcadores foi avaliada pela média geométrica da intensidade de fluorescência.

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, USA).

4.9 Avaliação da atividade fagocítica

A avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos diferenciados de precursores de medula óssea, na presença dos estímulos LPS (0,5 µg/mL), IFN-γ (50UI/mL) e rPoly p 5 (1µg/mL), foi realizada utilizando o kit *pHrodo™ phagocytosis particle labeling kit for flow cytometry* (Invitrogen™ - Thermo Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, o kit acima descrito é composto por bactérias Gram negativas (*E. coli*) conjugadas com a sonda fluorescente pHrodo™ succinimidil ester que emite fluorescência máxima em pH ácido, ou seja, a partir do momento em que são incorporadas às vesículas lisossomais. Nesse sentido, $2x10^7$ bactérias foram adicionadas aos tubos de citometria de 12x75mm (Falcon, BD-Bioscience) contendo $1x10^6$ macrófagos na presença dos estímulos acima descritos. As amostras foram incubadas por 15 minutos em banho a 37ºC. Após esse período, as partículas não fagocitadas foram removidas por lavagem com tampão específico do kit e após centrifugação a 350xg por 5 minutos, as amostras foram ressuspensas em tampão de citometria FCSB. 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, USA). Os resultados foram expressos pela porcentagem de células que incorporam as bactérias marcadas (pHrodo+) e pela média geométrica da intensidade de fluorescência da sonda.

4.10 Determinação da concentração de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura

O óxido nítrico (NO) liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinado usando um 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 50µL de reagente de Griess, que consiste em 1% de sulfanilamida; 0,1% de N-(1-naftil)-etilenodiamina e dicloridrato de ácido orto-fosfórico a 2,5%. Após 10 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida num leitor de microplacas Multiskan MS (Labsystems Oy, Helsink, Finlândia), no comprimento de onda de 540nm. As concentrações de óxido nítrico foram calculadas

por comparação com uma curva de calibração obtida com soluções padrão de nitrito de sódio.

4.11 Quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura

Sobrenadantes das culturas celulares foram utilizados para a quantificação das citocinas: pró-inflamatórias: IL-1α, IL-1β, 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 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 LEGENDplex™ Data Analysis Software V.8 (Biolegend).

4.12 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 de Dunnet´s e Teste de 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 e Discussão

5.1 Obtenção do alérgeno rPoly p 5

Conforme descrito em no **item 3.1**, foram crescidas placas, com meio de cultura YPD-ágar contendo as células X-33/pPICZαa- Poly p 5 (**Figura 6**).

Figura 6 – Placa de Petri com colônias de levedura contendo o inserto poly p 5. Placa contendo colônias de X-33/pPICZαA-Poly p 5 em meio YPD + Zeocina. A placa foi incubada a 28ºC, por 18 horas.

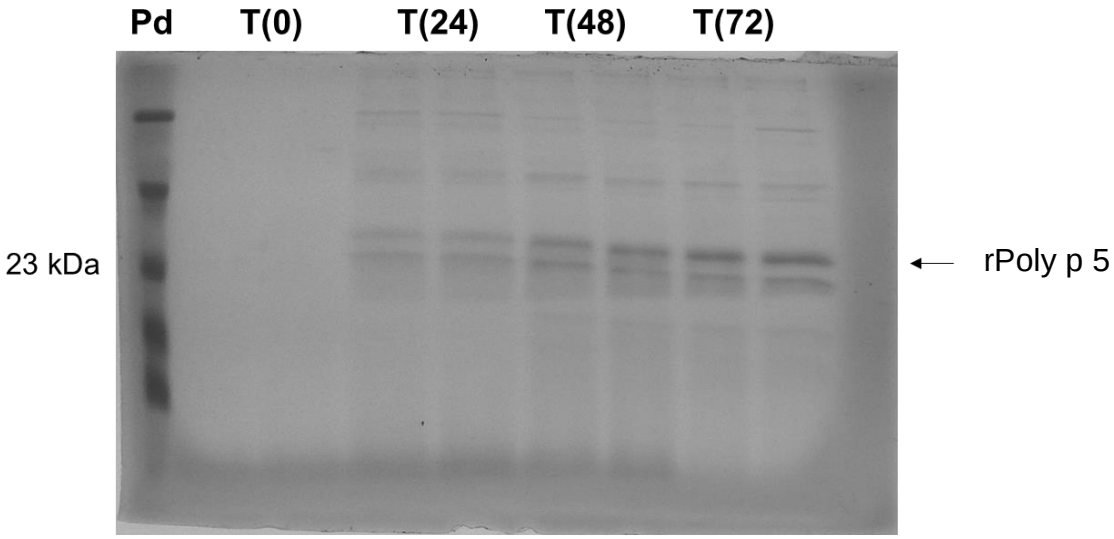


Após seleção de uma única colônia isolada da placa foi feita a incubação da pré-cultura de levedura em meio BMGY, o qual possui glicerol como única fonte de energia. Estas condições permitem que a levedura cresça de modo ideal, sem que ocorra qualquer ativação do cassete de genes, onde foi clonado o gene heterólogo da proteína Poly p 5. A fase exponencial do crescimento acontece quando a medida a DO_{600nm} da cultura atinge valores elevados ≥4.0, o que pode ser medido por leitura de alíquotas da cultura diluídas de 20 a 100x em água. Ao atingir este valor de densidade óptica, é calculado o volume/quantidade de células que devem ser utilizadas do pré-inóculo, para que tenha sempre uma DO_{600nm} inicial=1,0 (equivalente a ~ 5 x 10^7 células/mL) de forma a dar início à cultura (inóculo) de indução com metanol, em meio BMMY. Somente neste meio e em presença do metanol é que o gene heterólogo passa a ser induzido e expresso, levando-se ainda em consideração a extrema necessidade de oxigenação da cultura. Por este motivo é que foram sempre

utilizados frascos de Erlenmeyer aletados, volume de cultura 10x inferior ao volume dos frascos e elevada rotação do meio de cultura (220-250 rpm).

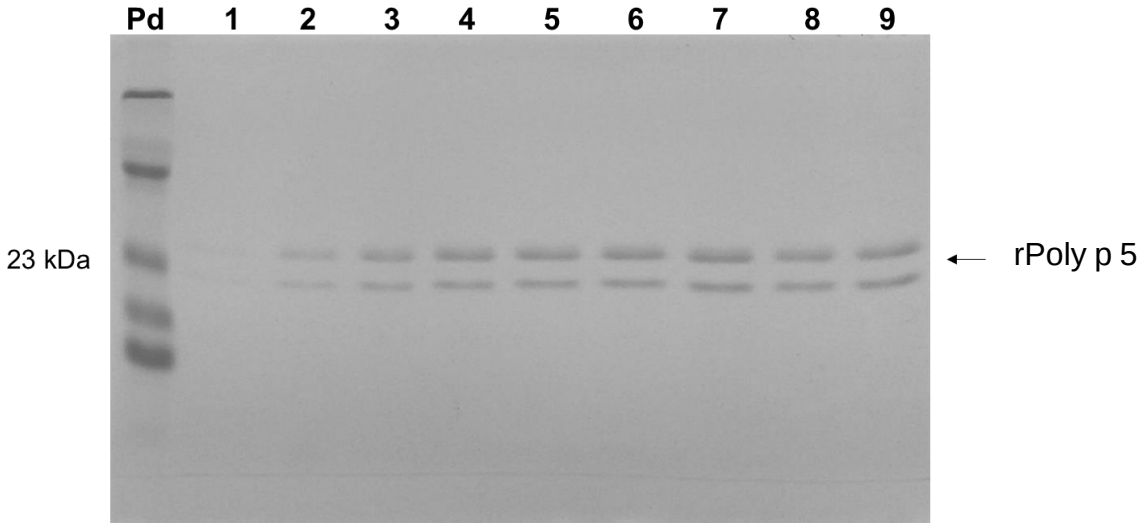
A fim de se determinar e confirmar o maior nível de expressão do alérgeno em função do tempo de crescimento de cultura, a cada 24 horas e antes de ser adicionado o indutor metanol, foras foram coletadas alíquotas da cultura para análise por meio de eletroforese denaturante (SDS-PAGE) (**Figura 7**). Pode-se observar nesta figura, pela presença de banda mais intensa, de massa molecular em torno de 23 kDa, que o tempo de 72 horas foi o que apresentou o melhor o nível de expressão do alérgeno de interesse, confirmando assim os resultados já observados por Bazon (2021).

Figura 7 - **SDS-PAGE a 12% de amostras da expressão de rPoly p 5 em *Komagataella phaffi* a 28ºC por 72 horas**. **Pd**: padrão de massa molecular (High-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences-GE Healthcare, USA), **T(0) a T(72)**: amostras de expressão de rPoly p 5 nos tempos de 0 a 72 horas.



Conforme descrito no **item 3.2** acima, após filtração e concentração em tampão fosfato, a amostra de rPoly p 5 de 72 horas foi submetida à purificação em coluna de afinidade de Ni-NTA-Agarose (His-Trap Ni^{+2}) e as alíquotas de eluição da coluna foram analisadas por SDS-PSGE 12%, como pode ser visto na **Figura 8**.

Figura 8 - **SDS-PAGE a 12% das alíquotas eluidas da coluna His-Trap Ni^{+2} de cromatografia de afinidade.** A maior intensidade de bandas no gel significa maior concentração de rPoly p 5. **Pd**: padrão de massa molecular (High-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences-GE Healthcare, USA), **1-9**: Amostras de rPoly p 5 das frações eluidas em tampão de eluição 75 mM de Imidazol (Na/PO_4 50 mM, NaCL 0,5 M e Imidazol 75 mM).



A partir da **Figura 8**, tendo em conta a ausência de bandas contaminantes no gel, podemos considerar que a proteína rPoly p 5 foi purificada de forma eficiente, após cromatografia de afinidade em coluna His-Trap Ni^{+2}. A quantificação da proteína purificada, após troca do tampão da coluna para PBS 1X foi de 639,46µg/mL, sendo considerada ideal para dar sequência aos ensaios imunológicos.

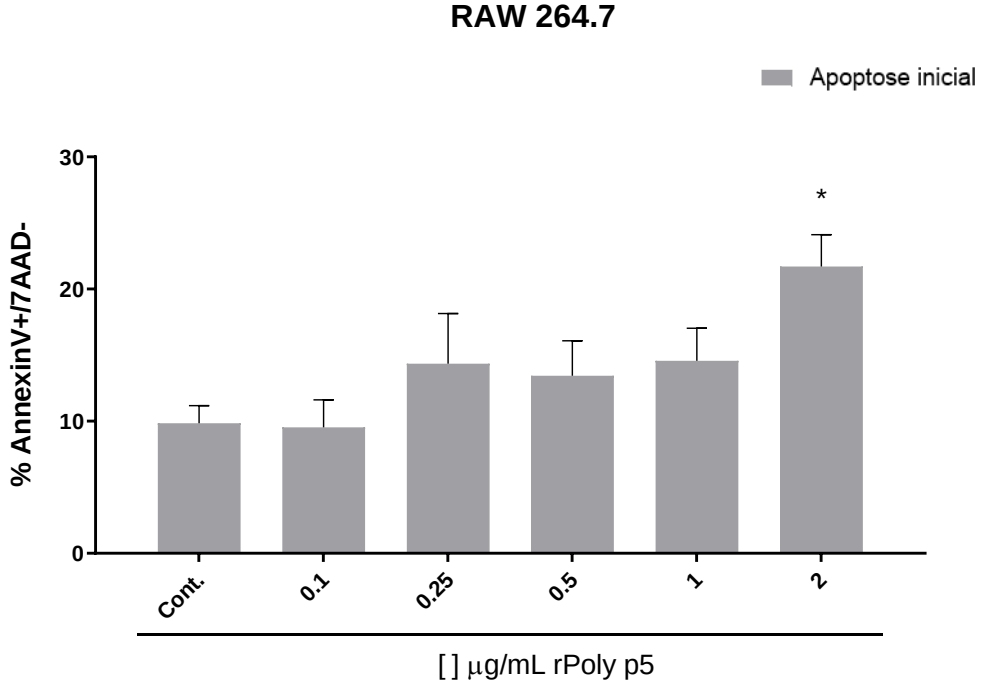
Com relação à obtenção de duas bandas, diferentes em cerca de 10 kDa (Banda superior - 23 kDa e banda inferior - ~33kDa) no gel da **Figura 8** após a purificação de rPoly p 5, conforme já caracterizado e discutido por Bazon (2021), trata-se da presença de N-glicosilação, adicionada pela levedura *Komagataella phaffii*, durante a expressão de rPoly p 5. Interessantemente, este mesmo alérgeno em *Solenopsis invicta* (Sol i 3) e também em *Polybia scutellaris* (Poly s 5), também exibiu a presença de dupla banda em SDS-PAGE de acordo com o que foi descrito por Schiener et al. (2017) e Vinzón et al. (2010), respectivamente, mesmo após todos os processos de purificação. Para estes autores, os dados foram resultantes de diferentes expressões do processamento pós-traducional, nas extremidades N-terminais das proteínas, como por exemplo, a glicosilação. Estes resultados não foram impeditivos para dar continuidade aos ensaios com células, tendo por exemplo, o teste de ativação de basófilos (SCHIENER et al., 2017).

5.2 Efeito do rPoly p 5 na viabilidade celular

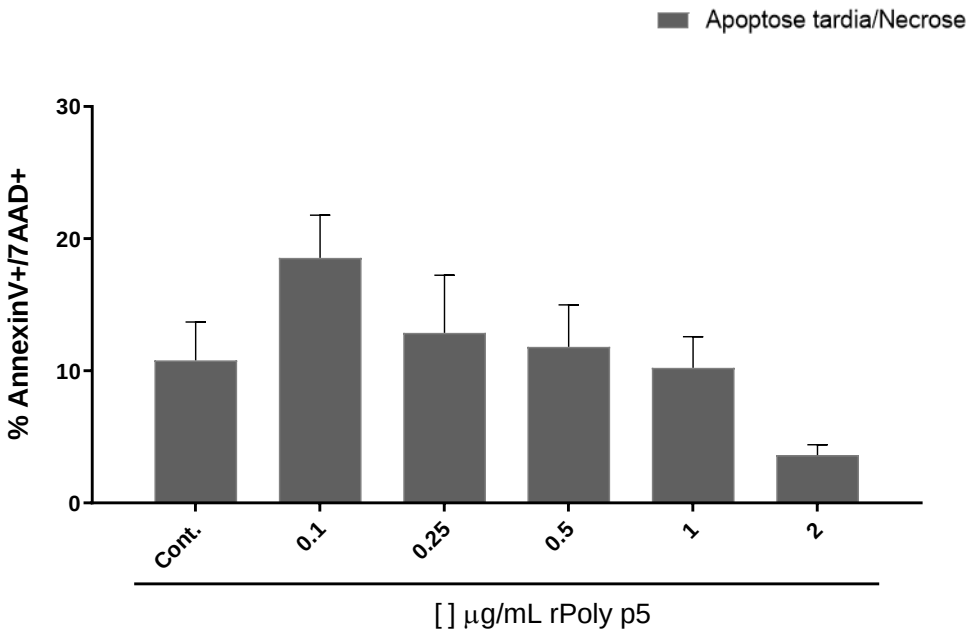
Possíveis danos celulares induzidos pelo alérgeno rPoly p 5 em linhagem de células tumorais de macrófagos murinos RAW 264.7 e J774 foram investigados. Para isso, conforme mencionado no **item 3.7**, foi realizada a avaliação dos mecanismos de morte celular através de um ensaio de dupla marcação das células, utilizando o Fitc Annexin V apoptosis detection Kit, with 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (Biolegend, San Diego, CA, EUA).

Na **Figura 9** podemos observar que, para ambas as linhagens celulares, a maior dose testada, de 2µg/mL de rPoly p 5, já se apresenta como estimuladora de apoptose e com maior toxicidade para as células. Desta forma, os dados obtidos sugerem que a dosagem de 1µg/mL do alérgeno rPoly p 5 poderia ser utilizada em todas as análises imunológicas com BM-M. Estes resultados foram de importância pois confirmam que a dosagem escolhida foi realmente adequada, não apresentando risco dos ensaios estarem associados à presença de células mortas.

Figura 9- Viabilidade celular de cultura de linhagens macrofágicas RAW 264.7 e J744. As células foram analisadas após tratamento com diferentes concentrações de rPoly p 5 (0.1µg/mL; 0.25µg/mL; 0.5µg/mL; 1µg/mL; 2µg/mL). O ensaio de viabilidade celular representa a identificação de células apoptóticas e necróticas. O gráfico indica a porcentagem de células macrofágicas na fase inicial de apoptose (**Painéis A e C**) e na fase tardia de apoptose (necrose) (**Painéis B e D**). As barras representam média ± (E.P.M) nos sobrenadantes das culturas. (RAW 264.7: N=09; J 774: N=12).*p<0,05 ANOVA

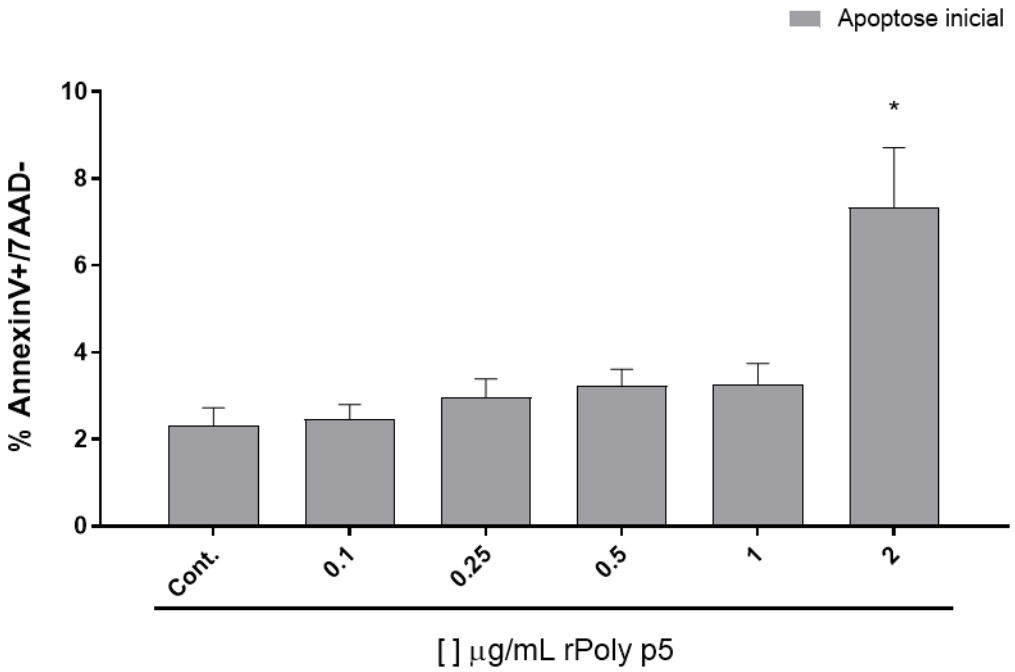


B

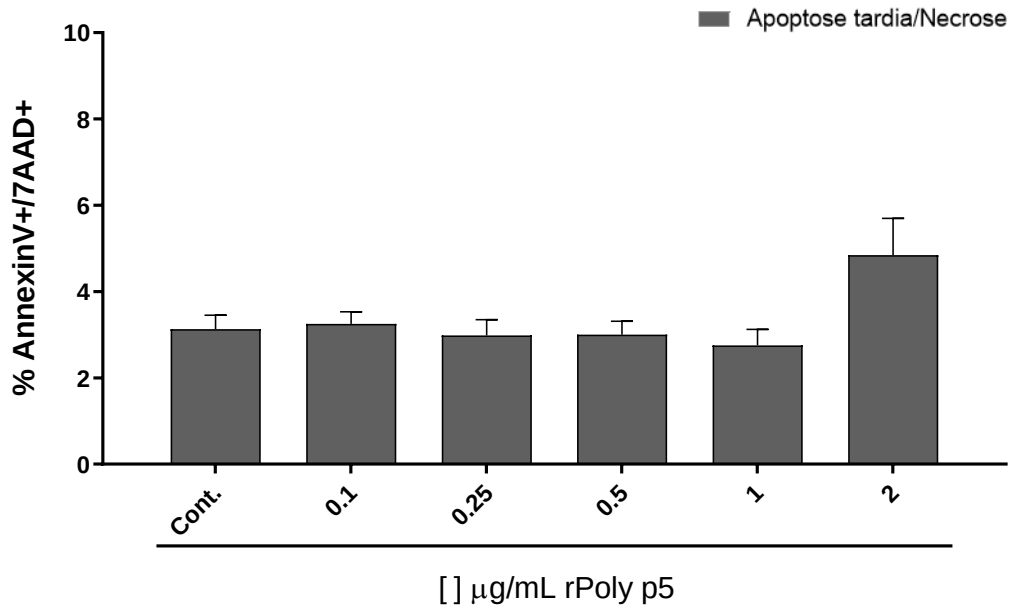

Apoptose tardia/Necrose
% AnnexinV+/7AAD+
30
20
10
0
Cont.
0.1
0.25
0.5
1
2
[ ] μg/mL rPoly p5

J 774

C


Apoptose inicial
% AnnexinV+/7AAD-
10
8
6
4
2
0
*
Cont.
0.1
0.25
0.5
1
2
[ ] μg/mL rPoly p5

D

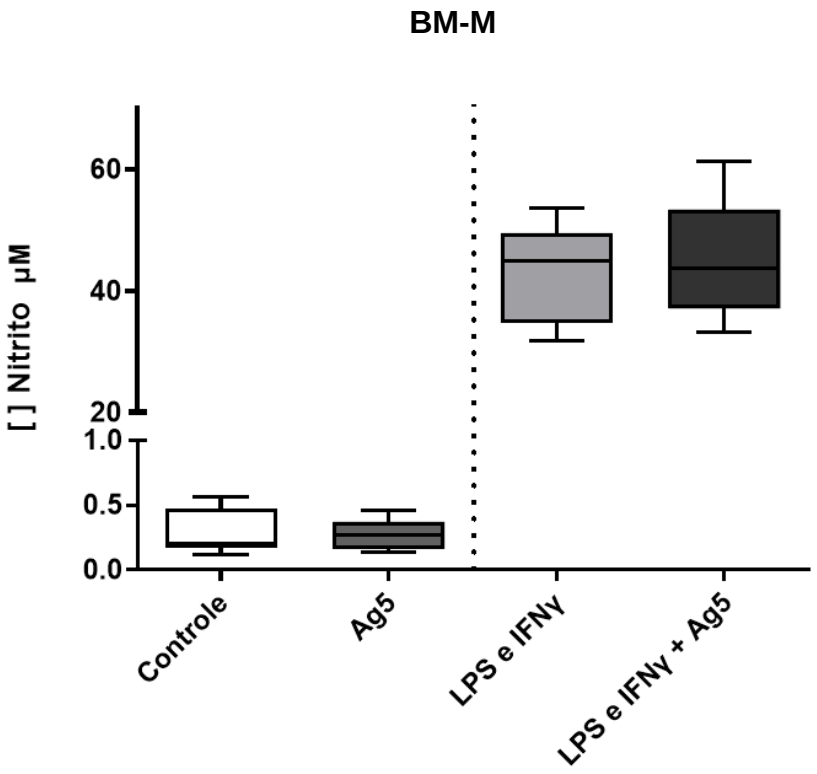


5.3 Efeito do rPoly p 5 na produção de óxido nítrico por BM-M

Macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea (BM-M), em concentrações ajustadas de 2x10⁵ por poço, foram tratadas com 1µg/mL de rPoly p 5, na presença/ausência de LPS e IFN-γ (0,5 µg/mL e 50UI/mL, respectivamente) e analisadas para verificar os efeitos desses estímulos na produção de óxido nítrico (NO).

Como é possível observar na **Figura 10**, não houve diferença significativa na produção de NO na presença de rPoly p 5 quando comparado aos grupos controle. O estímulo com LPS e IFN-γ aumentou significativamente a produção de óxido nítrico quando comparado com os grupos não estimulados com esses estímulos pró-inflamatórios. Corroborando com estes dados, Cecilio (2011) e Mills (2000), mostraram que macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea de camundongos BALB/c, quando estimulados com as quantidades supracitadas de LPS e IFN-γ, aumentam significativamente a produção de óxido nítrico.

Figura 10 – Efeito do rPoly p 5 na produção de óxido nítrico por BM-M. Células precursoras da medula óssea obtidas de camundongos da linhagem BALB/c foram diferenciadas em BM-M, sendo que parte das culturas foi estimulada com os estímulos pró-inflamatórios (0,5 µg/mL de LPS + 50UI/mL de IFN-γ) – lado direito do gráfico – enquanto a outra parte não recebeu estímulos – lado esquerdo do gráfico. Concomitantemente à adição destes estímulos, as células foram incubadas com rPoly p 5 na concentração de 1 µg/mL (boxplots escuros) por 48h, sendo que os controles receberam apenas meio de cultura (boxplots claros). Os dados de concentração foram representados por boxplots de Turkey. (N=46).



Cecilio (2011) relata ainda que a quantidade de NO corresponde diretamente à atividade da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) dessas culturas, sendo que quanto maior os níveis de NO, maior a atividade da iNOS. A análise da secreção de mediadores pró-inflamatórios, como o NO, é de elevada importância pois é uma maneira efetiva de acompanhar processos e condições inflamatórias (KIM et al., 2016). Sabe-se que o NO atua no controle imunológico da relação patógeno-hospedeiro, e que é sintetizado sobre demanda, pois não fica armazenado *in vivo*, sendo produzido em grandes quantidades pelos macrófagos durante a resposta inflamatória, causando "danos oxidativos" letais às células-alvo (BARRETO et al., 2005).

A saliva de carrapatos, bem como o veneno de abelha, é uma mistura complexa e heterogênea, possuindo diversos compostos com potencial imunomodulador (RODRIGUES et al*.,* 2018). Um estudo recente com a saliva do carrapato *Amblyomma variegatum* evidenciou aumento na secreção de NO, após tratamento de macrófagos bovinos com quantidades menores da saliva, sendo que, após tratamento com quantidades mais elevadas da saliva, há uma diminuição significativa na secreção de nitrito (RODRIGUES et al*.,* 2018). Além disso, Jang et al. (2005) relataram que o veneno de abelha (*Apis mellifera*) inibiu a secreção de NO em macrófagos da linhagem RAW 264.7, indicando papel anti-inflamatório inibindo a iNOS possivelmente através da supressão da via do NF-κB.

Corroborando com nossos dados, resultados ainda não publicados de nosso grupo de pesquisa indicam ausência do efeito do rPoly p 5 sobre a secreção de NO em macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c ativados ou não com LPS. A ineficácia do alérgeno rPoly p 5 em ensaios de mensuração de NO após tratamento em BM-M sugere que esta molécula não possui papel modulador da expressão de NO em macrófagos.

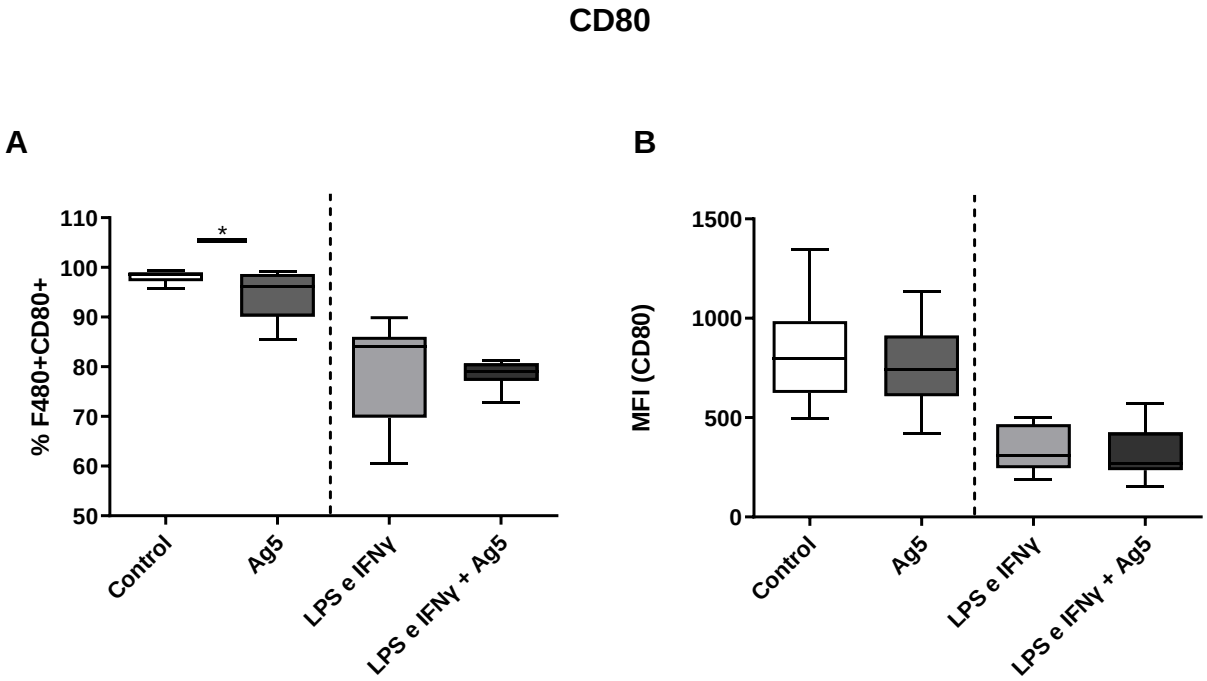
5.4 Efeito do rPoly p 5 na expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 e de MHC-II em BM-M

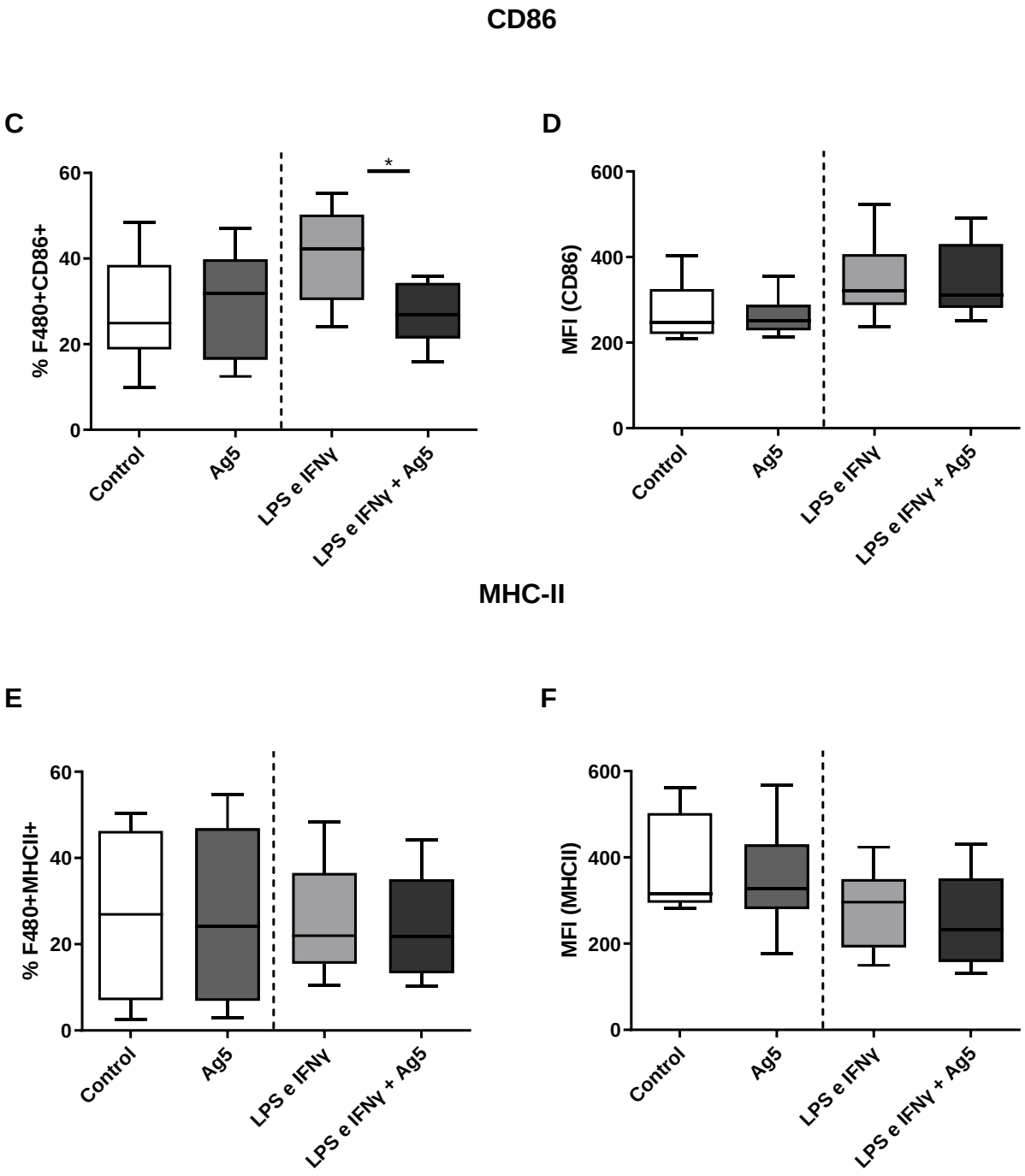
Para avaliar o efeito do estímulo com rPoly p 5 na expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 e de MHC-II, parte das culturas de BM-M foi estimulada com os estímulos pró-inflamatórios (LPS - 0,5 µg/mL + IFN-γ - 50UI/mL), enquanto a outra parte não recebeu estímulos. Concomitantemente à adição destes estímulos, as células foram incubadas com 1 µg/mL de rPoly p 5 por 48h, sendo que os controles receberam apenas meio de cultura. Após este período, foram realizados ensaios de citometria de fluxo, conforme descrito previamente por SIMIONI et al. (2017).

Conforme descrito no **item 3.8**, 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. Os resultados de avaliação da porcentagem de células positivas para marcadores CD80 e CD86, e para MHC-II podem ser observados na **Figura 11** (**painéis A, C e E**, respectivamente), enquanto a expressão relativa, determinada pela média geométrica

da intensidade de fluorescência do fluorocromo - MFI - associado aos respectivos anticorpos de detecção podem ser observados na mesma **Figura 11** (**painéis B, D e F**).

Figura 11 - **Expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, e MHC-II em BM-M.** Culturas de BM-M foram estimuladas com os estímulos pró-inflamatórios LPS (0,5 µg/mL) e IFN-γ (50 UI/mL), enquanto a outra parte não foi submetida à estimulação. Concomitantemente, as culturas foram incubadas na presença de 1 µg/mL de rPoly p 5, sendo que os controles receberam apenas meio de cultura por 48 horas. As análises foram feitas em células F4/80+ viáveis, comparando-se a porcentagem de células positivas para os marcadores CD80 (**Painel A**), CD86 (**Painel C**) e MHC-II (**Painel E**), bem como a expressão relativa destes marcadores, estabelecida pela média da incidência de fluorescência (MFI) (**Painéis B**, **D** e **F**, respectivamente). Os dados de porcentagem e MFI foram representados por boxplots de Turkey. (N=18) *<p,0.05.





Na **Figura 11** podemos observar que o tratamento com rPoly p 5 levou a diminuição da frequência de células expressando CD80 em BM-M não estimulados com LPS+IFN-γ (**Painel A**), todavia sem alterar a expressão desta molécula (**Painel B**). Notamos ainda que a frequência de células que expressam CD86 reduziu significativamente em BM-M estimulados (**Painel C**), mas também sem alteração na expressão deste marcador (**Painel F**). Por fim, verificamos que não houve alterações

quanto à frequência de células, ou expressão do marcador MHC-II (**Painéis E** e **F**, respectivamente) em culturas tratadas com rPoly p 5, estimuladas ou não com os estímulos pró-inflamatórios

Macrófagos M1 são caracterizados por expressarem níveis elevados de MHC-II, CD80 e CD86 (MILLS, 2015, NEVES, 2015). Por sua vez, macrófagos de perfil M2 são caracterizados por possuírem outros tipos de moléculas coestimuladoras, como CD163 e CD200R (MILY et al., 2020). LIU et al. (2013) e MILLS (2015) mostram que há uma plasticidade entre os fenótipos M1 e M2, sendo que a depender do estímulo recebido pela célula pode ocorrer uma mudança do fenótipo funcional. MILY et al. (2020) monstraram que, quando é utilizado GM-CSF para diferenciação de cultura *in vitro* de monócitos extraídos do sangue periférico de humanos, os macrógafos apresentam inicialmente o perfil M1, e quando é utilizado M-CSF para a diferenciação destas células, os macrófagos apresentam o perfil M2.

Nesse sentido, monstramos no **Painel A** da **Figura 11** que aproximadamente 100% dos macrófagos do grupo controle expressam CD80, enquanto o grupo que recebeu rPoly p 5 sofreu redução significativa na frequência das células expressando esta molécula. No **Painel C**, é possível observar um decaimento de aproximadamente 15% na frequência de macrófagos ativados expressando CD86 após tratamento com rPoly p 5. Estes dados corroboram, portanto, com a hipótese de que o alérgeno rPoly p 5 pode estar relacionado com uma possível alteração fenotípica dos macrófagos M1 para um outro perfil funcional.

Tavano et al. (2011) monstraram que o alérgeno apidaecina, um homólogo do antígeno 5, presente no veneno da abelha *A. mellifera*, promoveu aumento na expressão de CD80 em macrófagos ativados com LPS e diminuiu a expressão de MHC-II e CD86, diferindo do presente estudo, no qual não houve diferença significativa na quantidade de moléculas co-estimulatórias expressas (**Painéis B**, **D** e **F** - MFI), e sim na frequência de células expressando estas moléculas (**Painéis A** e **C**).

Kim et al. (2015), por sua vez, empregando macrófagos intraperitoneais, ativados e inativados com LPS, com o composto cucurbitacina B, uma molécula com potencial imunomodulador presente em muitos organismos do reino vegetal, mostraram que a molécula bloqueia a expressão de mediadores pró-inflamatórios nos grupos ativados com LPS, inibindo a expressão de MHC-II e CD80. Tais dados

sugerem que a cucurbitacina B possui efeitos imunomodulatórios anti-inflamatórios. Ainda, os autores sugeriram que, pelo fato de que CD80 e CD86 são moléculas fornecedoras de sinais coestimuladores necessários para a sobrevivência e ativação de células T (KIM et al., 2015), compostos naturais que induzem redução significativa nos níveis de expressão de moléculas coestimuladoras podem ter um papel mais eficiente na resposta imune adaptativa.

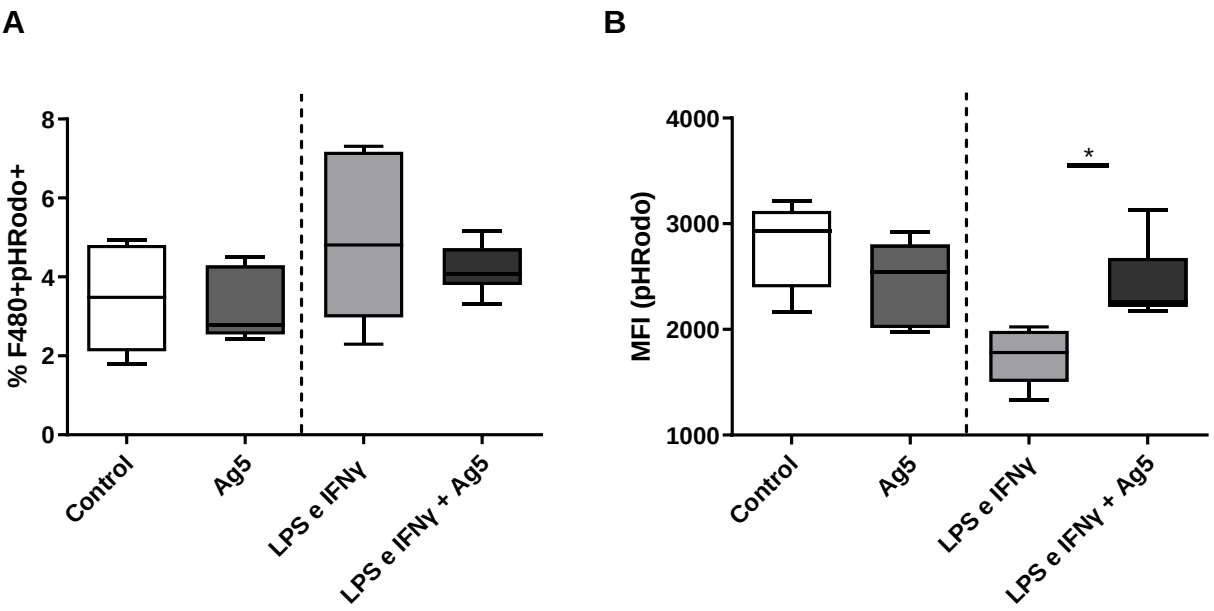
5.5 Efeito do rPoly p 5 na atividade fagocítica de BM-M

O macrófago é uma célula multifuncional, que exerce função imunológica importante nas atividades da defesa do organismo através da fagocitose, produção de agentes microbicidas, secreção de mediadores inflamatórios e processamento de antígeno. A fagocitose consiste na captura e destruição de microrganismos invasores (SETUBAL et al., 2011).

Para a avaliação do efeito do rPoly p 5 na atividade fagocítica de BM-M as culturas estimuladas ou não com os estímulos pró-inflamatórios (LPS - 0,5 µg/mL e IFN-γ - 50UI/mL), sob efeito do tratamento com rPoly p 5 (1 µg/mL) foram incubadas com bactérias Gram negativas (*E. coli*) conjugadas com a sonda fluorescente pHrodo™ succinimidil ester, que emite fluorescência máxima em pH ácido, ou seja a partir do momento em que são incorporadas às vesículas lisossomais. A **Figura 12** expressa os resultados obtidos nestes ensaios.

Com dez culturas obtidas pela diferenciação de células precursoras de dez animais em BM-M (N=10), foi observado que houve aumento significativo na intensidade de fluorescência (MFI) no grupo de macrófagos ativados (estimulados com LPS e IFN-γ) após tratamento com 1 µg/mL de rPoly p 5 (**Painel B**), sendo um indício de que houve maior quantidade de bactérias *E. coli* fagocitadas por estas células. Entretanto, não observamos nenhum efeito do rPoly p 5 na frequência (%) de células que apresentaram atividade fagocítica (**Painel A**) podendo indicar que rPoly p 5 atua potencializando a fagocitose de células já em atividade, mas sem induzir diretamente a ativação deste processo em células não ativadas.

Figura 12 – **Efeito do rPoly p 5 na atividade fagocítica de BM-M.** Culturas de BM-M diferenciadas de células precursoras da medula óssea de camundongos BALB/c, foram estimuladas com os estímulos pró-inflamatórios LPS (0,5 µg/mL) e IFN-γ (50 UI/mL), enquanto a outra parte não foi submetida à estimulação. Concomitantemente, as culturas foram incubadas na presença de 1 µg/mL de rPoly p 5, sedo que os controles receberam apenas meio de cultura por 48 horas (Boxplots brancos). A estas culturas foram adicionadas bactérias (*E.coli*) previamente marcadas com a sonda fluorescente pHrodo™ succinimidil ester. As análises foram feitas, comparando-se a porcentagem de células contendo bactérias fluorescentes no seu interior (**Painel A**), bem como a média da intensidade desta fluorescência (MFI) nas células positivas (**Painel B**). Os dados de porcentagem e MFI foram representados por boxplots de Turkey. (N=10) *<p,0.05.



Dados da literatura indicam que macrófagos de perfil M2 de camundongos da linhagem BALB/c possuem maior potencial de fagocitose do que macrófagos de perfil M1 (BERTOLINI et al., 2016; MULDER et al., 2014; SOUZA, 2014; XU et al., 2013). Mulder et al. (2014) também afirmam que os macrófagos utilizados em estudo apresentaram grande plasticidade podendo reverter suas características de M2 para M1, e vice-versa, após remoção/adição de estímulo indutor. Estes resultados corroboram com a hipótese levantada anteriormente, de que o rPoly p 5 poderia atuar como indutor de diferenciação dos BM-M para outro perfil de macrófagos, como o M2.

Um ensaio com veneno de cobra da espécie *Bothrops alternatus* sobre a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais sugere que o processo de fagocitose é ativado de forma dose dependente, sendo que quanto maior a dose de veneno

administrada (6 µg/mL), maior a porcentagem de fagocitose apresentada pelos macrófagos (35% - Controle vs. 46% -Tratados). Os autores afirmaram que a ativação dos macrófagos pelo veneno em estudo sugere a importância da função de leucócitos para a eliminação do veneno em indivíduos atingidos. Isso se deve ao fato deles fagocitarem debris celulares e facilitarem a regeneração de miofibrilas danificadas, já que a literatura indica que macrófagos induzem a quimiotaxia de células musculares e outros precursores de leucócitos estimulando a sua proliferação e promovendo regeneração celular (SETUBAL et al., 2011). Corroborando com estes achados, Chalamaiah et al. (2014) realizaram um estudo relacionando um hidrolisado de proteína do ovo da carpa *Labeo rohita* e sua atividade em macrófagos peritoneais. Esta proteína hidrolisada aumentou a capacidade fagocítica dos macrófagos, indicando que ela exerce uma função na melhora da habilidade da resposta imune do hospedeiro contra patógenos e antígenos.

Macrófagos ativados com atividade fagocítica intensa apresentam maior efetividade na eliminação de patógenos, e consequentemente na capacidade de eliminar micróbios ingeridos. Além disso, estas células quando ativadas, aumentam significativamente a produção de citocinas e a habilidade em ativar células T (CHALAMAIAH et al., 2014; MYLONAS et al, 2019). Dados do estudo de Xu et al. (2013) mostram que macrófagos pró-inflamatórios M1 podem adquirir maior atividade fagocítica de células jovens apoptóticas depois de expostos a M-CSF. Os autores hipotetizam que o recrutamento local *in vivo* de macrófagos M1 para modificá-los para perfil M2 é essencial para garantir uma limpeza silenciosa de células apoptóticas. Possivelmente, tal hipótese poderia explicar parcialmente os resultados obtidos no presente estudo, no qual se observou a modulação positiva da atividade fagocítica por rPoly p 5 em BM-M, podendo indicar uma possível plasticidade entre fenótipos M1/M2.

5.6 Efeito do rPoly p 5 na produção de citocinas em BM-M

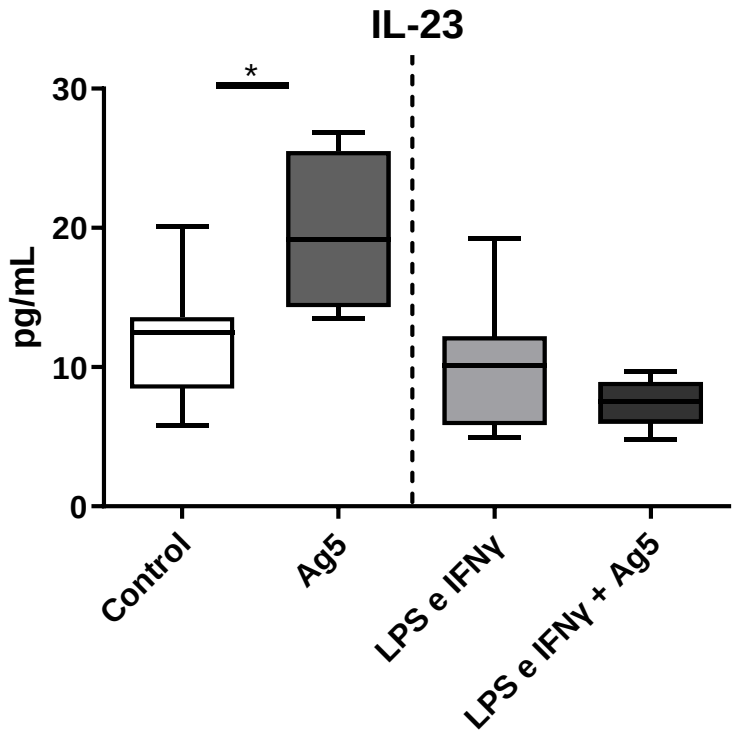
Para avaliarmos o efeito do rPoly p 5 na modulação do perfil de citocinas produzidas por BM-M, sobrenadantes de culturas de BM-M tratados (**Figura 13 A - M**, boxplots à direita) ou não tratados (**Figura 13 A - M**, boxplots à esquerda) com os estímulos pró-inflamatórios (LPS - 0,5 µg/mL + IFN-γ - 50UI/mL) e sob efeito do alérgeno rPoly p 5 (1 µg/mL) foram utilizados em imunoensaios baseados na detecção

simultânea de analitos por citometria de fluxo através do kit LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) (Biolegend), conforme descrito no **item 3.11**. Os dados foram obtidos em ensaios realizados com sobrenadantes de culturas obtidas de macrófagos diferenciados de 30 animais experimentais (N=30).

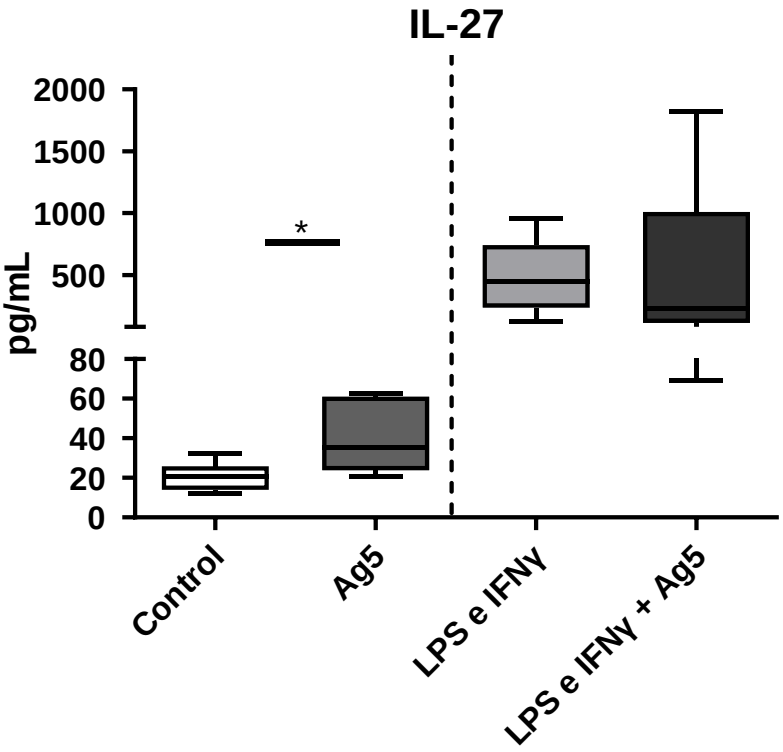
Podemos observar pelas figuras que houve modulação na produção das citocinas IL-23, IL-27, MCP-1 e GM-CSF. Notamos o aumento significativo das citocinas IL-23 e IL-27 em BM-M não estimulados com LPS e IFN-γ e tratados com rPoly p 5 (**Painéis A** e **B**, respectivamente). No **Painel C** é possível observar que em BM-M ativados após tratamento com rPoly p 5 houve a redução da quimiocina MCP-1. Em contrapartida, a citocina GM-CSF, por sua vez, apresentou níveis aumentados em BM-M ativados, após tratamento com rPoly p 5 (**Painel D**). Para as demais citocinas não pudemos observar alterações significativas na modulação destas sob influência de rPoly p 5 (**Painéis E - M**).

Figura 13 – **Efeito do rPoly p 5 na produção de citocinas em BM-M.** Culturas de BM-M diferenciadas de células precursoras da medula óssea de camundongos BALB/c, foram estimuladas com os estímulos pró-inflamatórios LPS (0,5 µg/mL) e IFN-γ (50 UI/mL), enquanto a outra parte não foi submetida à estimulação. Concomitantemente, as culturas foram incubadas na presença de 1 µg/mL de rPoly p 5, sendo que os controles receberam apenas meio de cultura (Boxplots bancos). Os dados de concentração das citocinas foram representados por boxplots de Tukey: IL-23 (A), IL-27 (B), MCP-1 (C), GM-CSF (D), IL-1α (E), IFN-γ (F), IL-12p70 (G), IL-1β (H), IL-6 (I), IL-10 (J), IL-17A (K), IFN-β (L) e TNF-α (M); (N=30), *p<0,05.

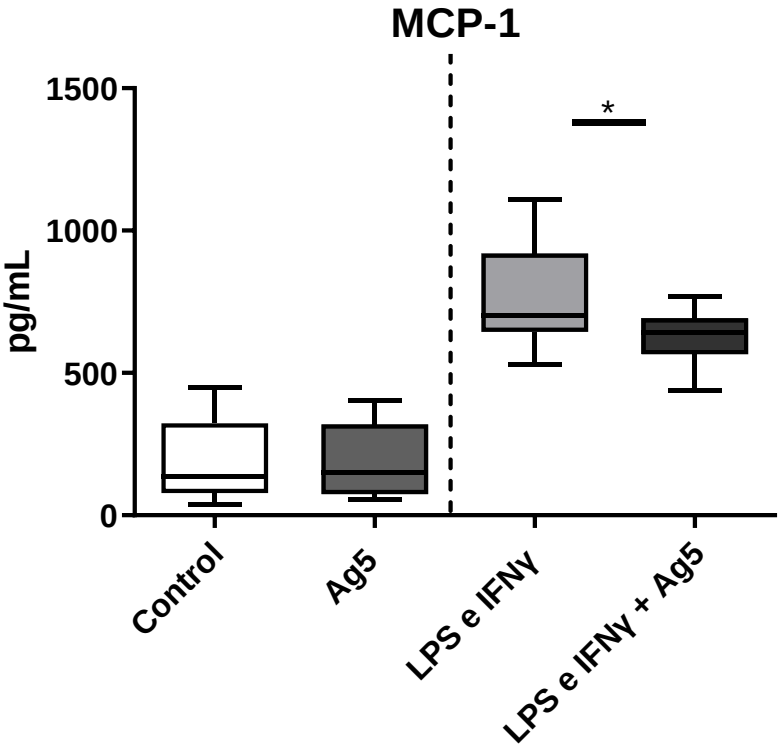
A -



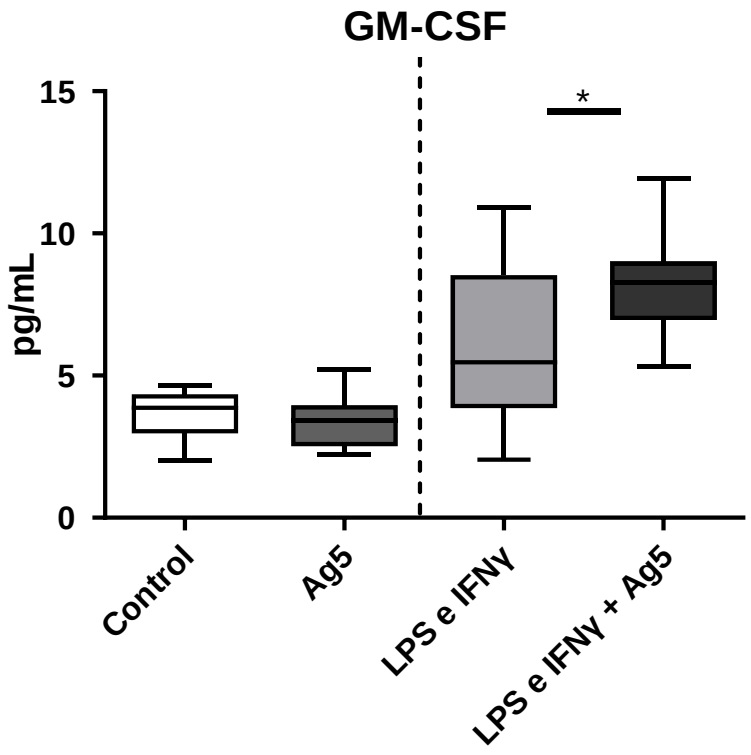
B -


IL-27
2000
1500
1000
500
80
60
40
20
0
pg/mL
*
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

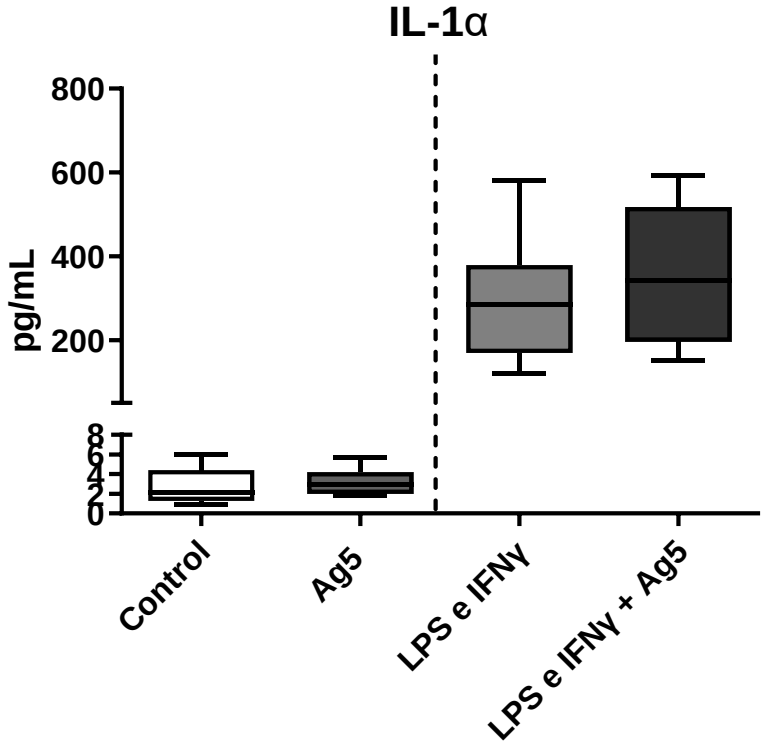
C -


MCP-1
1500
1000
500
0
pg/mL
*
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

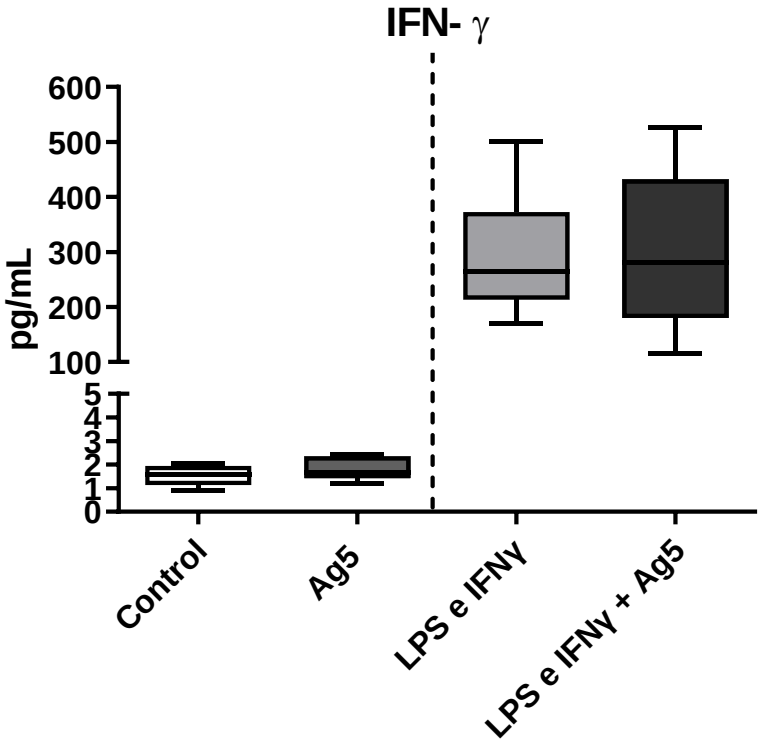
D -


GM-CSF
pg/mL
15
10
5
0
*
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

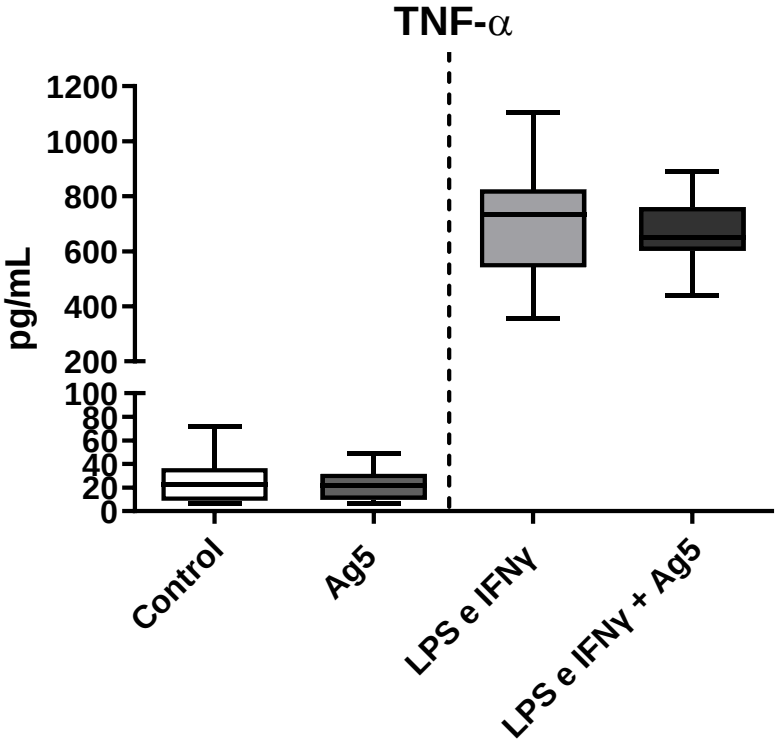
E -


IL-1α
pg/mL
800
600
400
200
8
6
4
2
0
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

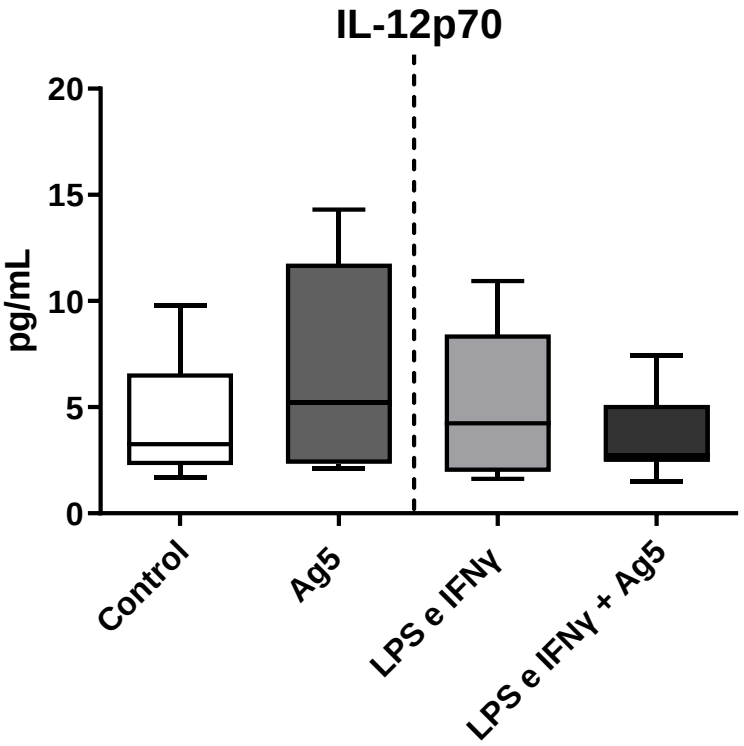
F -


IFN- γ
pg/mL
600
500
400
300
200
100
5
4
3
2
1
0
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

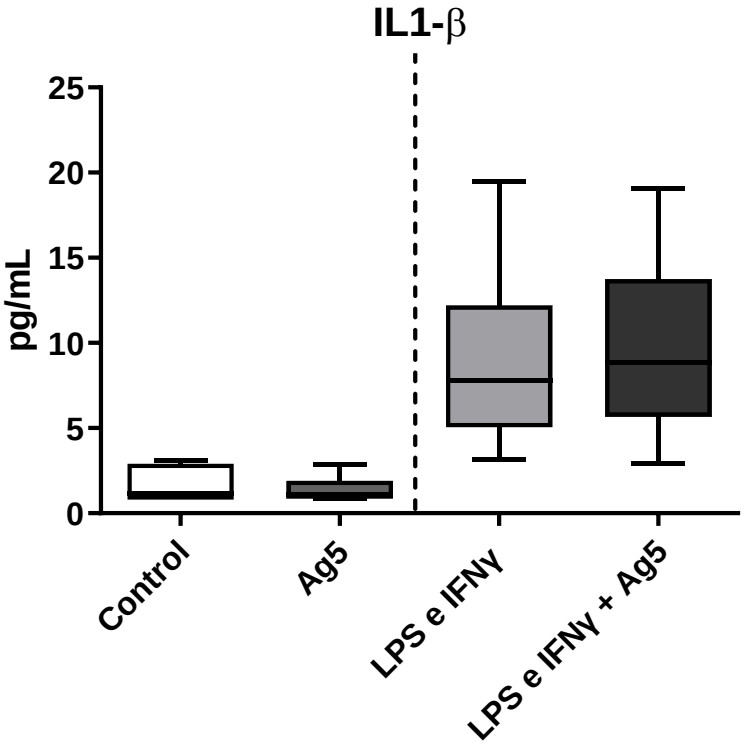
G -


TNF-α
pg/mL
1200
1000
800
600
400
200
100
80
60
40
20
0
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

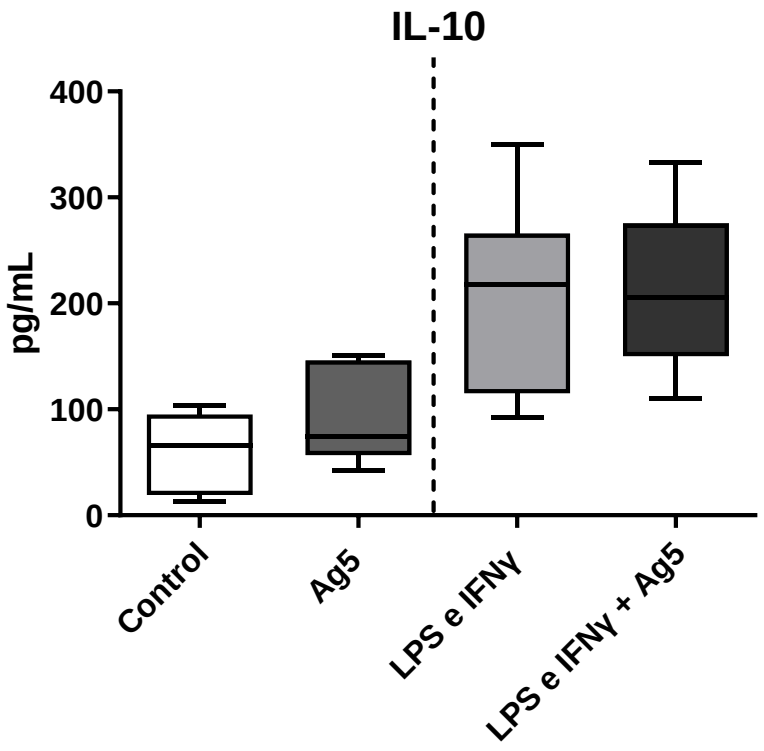
H -


IL-12p70
pg/mL
20
15
10
5
0
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

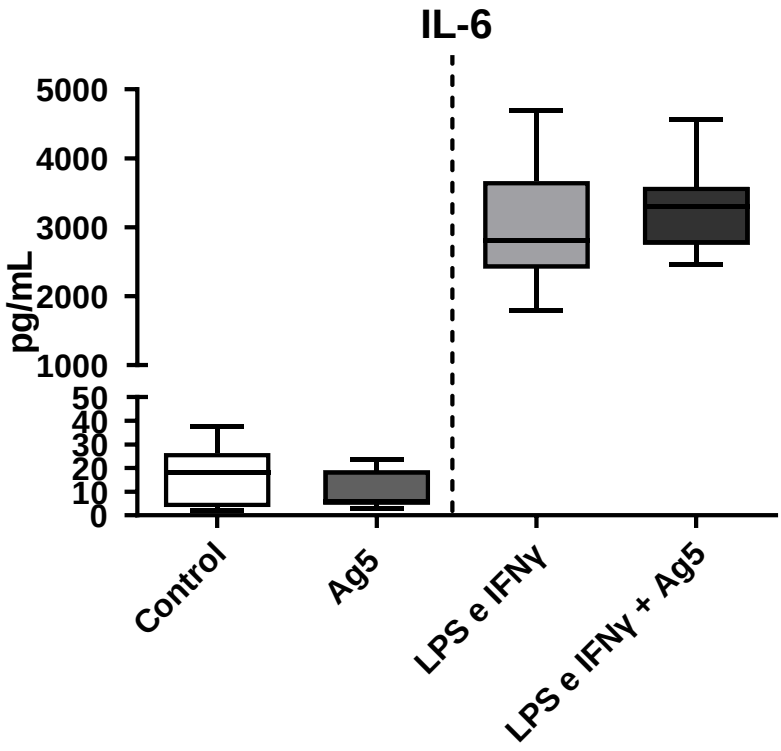
I -


IL1-β
pg/mL
25
20
15
10
5
0
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

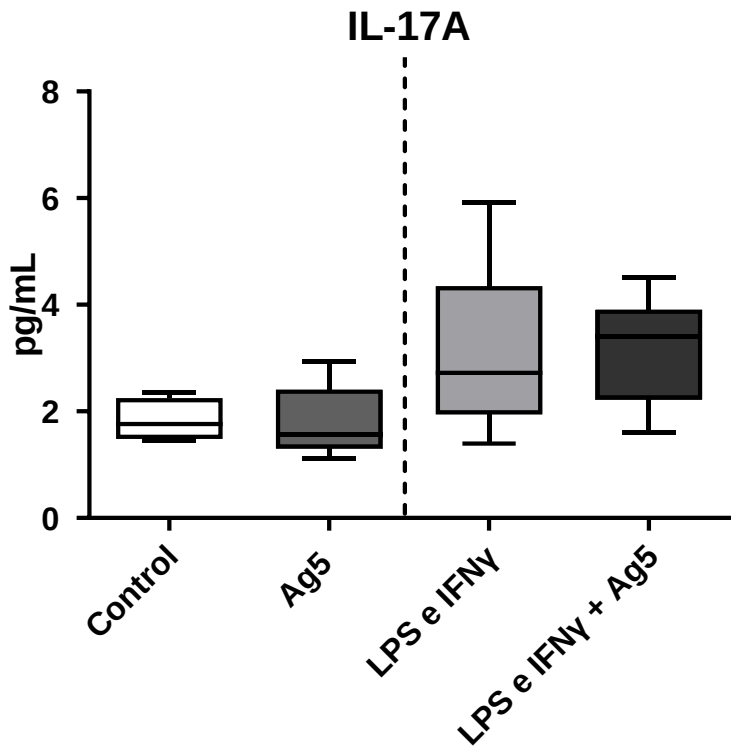
J -


IL-10
400
300
200
100
0
pg/mL
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

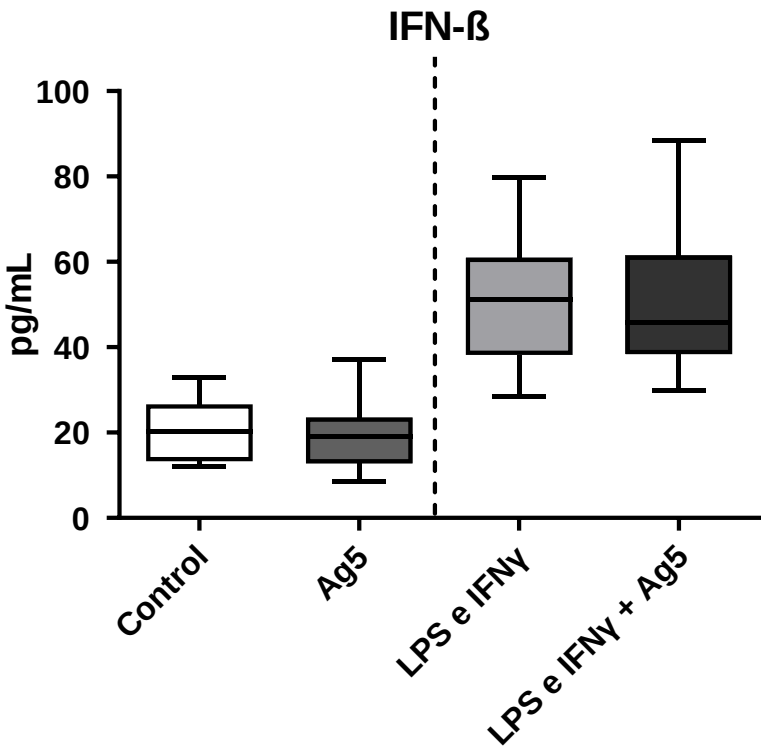
K -


IL-6
5000
4000
3000
2000
1000
50
40
30
20
10
0
pg/mL
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

L -


IL-17A
pg/mL
8
6
4
2
0
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

M -


IFN-ß
pg/mL
100
80
60
40
20
0
Control
Ag5
LPS e IFNγ
LPS e IFNγ + Ag5

A citocina IL-27 faz parte da família das citocinas IL-6 (ROSE-JOHN, 2018). A IL-23 está estruturalmente relacionada a esta família por meio da família IL-12, à qual pertence (CHYUAN, LAI, 2020). As subunidades α dessas três citocinas, sendo estas IL27p28, IL23p19 e IL12p35, são caracterizadas por se comporem de um feixe de quatro α-hélices, como a citocina IL-6. Estas se ligam a uma β subunidade, sendo a p40 para IL-23 e para IL-12, e a EBI3 (Epstein-Barr-virus-induced gene 3) para IL-27 (COLGAN, ROTHMAN, 2006; NICOLA, HILTON, 1998; TAIT WOJNO et al., 2019). Apesar de estarem relacionadas, a IL-23 e a IL-27 possuem papéis distintos, porém importantes, na resposta imune. Tait Wojno et al. (2019) afirmam que os membros das famílias IL-6 e IL-12 não são exatamente pró ou anti-inflamatórios, mas que podem atingir diferentes características de acordo com o microambiente e com a presença de outros estímulos. Enquanto a IL-23 é, caracteristicamente, um fator de ação positiva para a resposta Th-17, a citocina IL-27 apresenta um efeito oposto na geração de respostas destas células. (COLGAN, ROTHMAN, 2006; IWAKURA et al., 2008).

Hou et al. (2018) relatam que a IL-23 apresenta importante papel na polarização de macrófagos para um perfil funcional distinto das populações M1 e M2, que está relacionado com a exacerbação do quadro inflamatório em modelo experimental murino de psoríase. Nesse sentido, o aumento da produção desta citocina por rPoly p 5 pode indicar também um papel na diferenciação de outros fenótipos funcionais além de M2, enquanto o aumento da citocina IL-27 pode estar inibindo o desenvolvimento de uma resposta Th-17. Jafarzadeh et al. (2021) afirmam que a dosagem, o tempo de estímulo e a rota da admnistração de IL-27 influenciam fortemente as funções relacionadas à esta citocina, e que é necessária padronização desses parâmetros para uso em alternativas terapêuticas. Seguindo este raciocínio, devemos considerar que o mesmo deve ser feito com a proteína alergênica rPoly p 5 em relação ao perfil de expressão de citocinas inflamatórias, já que cada citocina possui sua cinética de expressão.

Por outro lado, Croxford et al. (2014) relatam que níveis desregulados de IL-23 afetam a função primária de barreira e vão refletir em doenças na pele, intestino e pulmão, como psoríase, doença inflamatória intestinal (DII) e crescimento tumoral. Seguindo este raciocínio, podemos levantar a hipótese de que a função do rPoly p 5 no veneno seja modular positivamente a expressão de IL-23 de modo que estes sintomas se manifestem em respostas alérgicas. Peng et al. (2010) mostram que, em

um modelo murino de asma alérgica, a citocina IL-23 possui papel fundamental na regulação da inflamação alérgica de vias aéreas por promover o desenvolvimento da resposta Th2 neste contexto. Ainda, os camundongos deficientes em IL-23 apresentaram inflamação reduzida das vias aéreas, e em experimentos *in vitro*, a sinalização da IL-23 com seu receptor aumentou a expressão de citocinas Th2.

MCP-1 (CCL2) é uma quimiocina reguladora da migração e infiltração dos macrófagos e já foi comprovado seu envolvimento em inúmeras doenças, como esclerose múltipla, artrite reumatoide, arteriosclerose e diabetes resistente à insulina (DESHMANE et al., 2009). Ela é classificada como inflamatória (PALOMINO, MARTI, 2015), sendo induzida por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-8, e promovendo recrutamento e ativação de monócitos aos locais de destino (SHERBET et al., 2011).

Um estudo com o ácaro *Dermatophagoides pteronissinus* sobre a resposta inflamatória de um modelo *in vitro* de monócitos primários mostra que ocorre aumento da produção de MCP-1, de maneira dose-dependente e tempo-dependente por estas células (LEE et al., 2008). Sabe-se que ácaros, de diversas espécies, possuem um importante papel no desenvolvimento de doenças alergênicas como asma e dermatite atópica (LEE et al., 2008).

Da mesma maneira, o estudo de Tavano et al. (2011) realizado para avaliar a ação imunológica da apidaecina sobre macrófagos humanos ativados ou não com LPS gerou respostas importantes. Os macrófagos sem a presença de LPS sofreram modulação positiva significativa após tratamento com a molécula, porém o grupo tratado com LPS também apresentou queda na expressão de MCP-1. Corroborando com estes achados, resultados ainda não publicados de nosso grupo monstraram a redução significativa na produção de MCP-1 por macrófagos intraperitoneais previamente estimulados com LPS e tratados com rPoly p 5 (BAZON, 2021).

Neste sentido, Kaushik et al. (2014) monstraram que o veneno da vespa *Vespa tropica* possui propriedades anti-inflamatórias por atenuar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como MCP-1, na linhagem celular murina de células da micróglia - BV-2 -, após tratamento e sob estimulação de LPS.

GM-CSF, por sua vez, é uma citocina imunomoduladora indutora da diferenciação celular em macrófagos. Ela é capaz de afetar diversas células, não somente macrófagos, como também promove a ativação de linfócitos T, suprime diferentes doenças autoimunes em animais, promove a sobrevivência e proliferação

celular através de diversas vias sinalizadoras e promove respostas inflamatórias (BHATTACHARYA et al., 2015).

Draijer et al. (2017) e Naessens et al. (2016) relatam ocorrência de maturação prejudicada em macrófagos alveolares em um modelo murino de asma no contexto da inflamação alérgica devido à sua deficiência em GM-CSF. Após a administração dessa citocina, os macrófagos sofreram maturação adequada e melhora na habilidade de defesa contra exacerbações virais do contexto alérgico-asmático.

GM-CSF promove a polarização de macrófagos para o fenótipo M1, que é um fator chave para a resposta imunológica (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Xu et al. (2013), em seu estudo sobre perfis de macrófagos M1 e M2, afirmam que macrófagos previamente diferenciados com M-CSF atingiram um perfil de resposta M2, e após sofrer exposição por 6 dias com GM-CSF, começa a exibir um perfil M1 com menor produção de citocinas anti-inflamatórias e menor capacidade fagocítica. Tait Wojno et al. (2019) relataram estudos que evidenciaram a capacidade de IL-23 em promover a expressão de GM-CSF por células T. GM-CSF também atua como um regulador positivo da função inflamatória de macrófagos intestinais (CASTRO-DOPICO et al., 2020).

Mylonas et al. (2019) relataram que o tratamento de macrófagos diferenciados de células da medula óssea com GM-CSF reduz a sua capacidade fagocítica sobre células apoptóticas e *beads* de látex. Os autores propõem que, embora a maioria dos estudos sugiram o efeito do GM-CSF como indutor de polarização de macrófagos para o perfil M1 *in vitro*, há um papel de extrema importância desta citocina para a ativação do perfil M2 em macrófagos durante lesões renais (HUEN et al., 2015). Nesse sentido, pudemos observar em nosso trabalho que BM-M ativados e tratados com rPoly p 5 apresentaram aumento na expressão de GM-CSF, e que, pelos dados obtidos nos experimentos de fagocitose e da análise da expressão de CD80 e CD86, há indícios da modulação do perfil macrofágico em sentido ao fenótipo M2.

A polarização macrofágica não é estática, sendo que somente a estimulação do GM-CSF pode não ser, por si só, o fator decisivo para a determinação fenótipo funcional. Em última análise, o fenótipo funcional a ser definido será dependente da capacidade destas células de integralizarem diferentes estímulos e sinais dos microambientes em que se encontram a fim de apresentar uma resposta imunológica mais adequada ao contexto em que se encontram.

6. Conclusões

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o alérgeno rPoly p 5 é tóxico na dosagem de 2 µg/mL, sendo então válida a utilização da dose de 1µg/mL para todos os ensaios realizados neste estudo.

É possível concluir também que a ineficácia do alérgeno rPoly p 5 na indução ou supressão da produção de NO, após tratamento em BM-M, está possivelmente relacionada ao fato de que este alérgeno não possui papel modulador da expressão de NO em macrófagos, o que corrobora com os resultados já obtidos com macrófagos intrapertoneais adultos (BAZON, 2021).

A proteína alergênica rPoly p 5 promoveu aumento da quantidade de bacterias Gram negativas fagocitadas por macrófagos ativados mas não aumentou a quantidade de macrófagos com atividade fagocítica neste grupo, sugerindo que ela atua potencializando a fagocitose de células já em atividade, sem induzir diretamente este processo em células não ativadas.

Pelos dados de que o rPoly p 5, na dose de 1µg/mL, aumentou a expressão das citocinas IL-23 e IL-27 em BM-M não ativados e GM-CSF em BM-M ativados, podemos levantar a hipótese de que talvez a função do rPoly p 5 no veneno seja modular positivamente a expressão de IL-23 de modo que, sintomas relacionados ao aumento desta citocina se manifestem em respostas alérgicas.

Além disso, o aumento da produção da citocina IL-23 por rPoly p 5 pode indicar um papel na diferenciação de outros fenótipos funcionais além de M2, enquanto o aumento da citocina IL-27 pode estar inibindo o desenvolvimento de resposta Th-17.

Por outro lado, o alérgeno nesta mesma dose modula negativamente a expressão de MCP-1 (CCL2) em BM-M ativados, sugerindo uma resposta anti-inflamatória para este alérgeno.

A proteína alergênica rPoly p 5 não apresentou alterações significativas na produção das demais citocinas (IL-1α, IFN-γ, IL-12p70, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-β e TNF-α) diante do modelo experimental.

A modulação positiva da atividade fagocítica por rPoly p 5 e da expressão de GM-CSF em BM-M ativados, bem como, a redução na expressão de marcadores e moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, em BM-M inativados e ativados, respectivamente, sugerem um papel importante deste alérgeno na polarização de

fenótipos funcionais de macrófagos além dos fenótipos clássicos M1 e M2. Lembrando que a polarização macrofágica não é estática, mas que possui a capacidade de integralizar diferentes estímulos e sinais e utiliza esta plasticidade para realizar uma resposta imunológica mais adequada para o microambiente em que os macrófagos se apresentam.

A avaliação do potencial pró ou anti-inflamatório do alérgeno rPoly p 5, por meio da análise das respostas dos macrófagos jovens, ainda não levou a um esclarecimento completo sobre o papel imunomodulador desta proteína.

7. Considerações finais

Foram apresentados dados importantes da relação rPoly p 5/imunomodulação sobre macrófagos diferenciados de precursores da medula óssea neste estudo. Nosso grupo conduziu análises em paralelo sobre linhagens tumorais (J774 e RAW 267.4) e macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c com o objetivo de embasar dados obtidos e esclarecer o efeito imunológico do alérgeno antígeno 5.

Análises adicionais, possivelmente com perfil dose-dependente e principalmente com perfil tempo-dependente, estão previstas para elucidar questões remanescentes que se formaram em relação às respostas geradas pela proteína alergênica neste estudo.

Nesse sentido, ensaios comparativos de rPoly p 5 com o veneno bruto de *Polybia paulista* e outros alérgenos majoritários de seu veneno também seriam importantes para uma melhor compreensão do papel dos diferentes alérgenos na modulação de importantes componentes da imunidade inata, envolvidos nas respostas alérgicas ao veneno desta espécie de vespa.

8. Referências

AALBERSE, R. C. "Structural biology of allergens", **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 2, p. 228–238, 2000. DOI: 10.1007/s11882-005-0012-1.

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., et al. "Order hymenoptera", **Zootaxa**, v. 3703, n. 1, p. 51–62, 2013. DOI: 10.11646/zootaxa.3703.1.12.

AGUIAR, M. B. De. "Estudo estrutural por RMN do Peptídeo Policatiônico Polybine I de Veneno da Vespa Social Polybia paulista", 2006.

AMBARUS, C. A., KRAUSZ, S., VAN EIJK, M., et al. "Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages", **Journal of Immunological Methods**, v. 375, n. 1–2, p. 196–206, 2012. DOI: 10.1016/j.jim.2011.10.013.

ARIF, F., WILLIAMS, M. **Hymenoptera Stings Pathophysiology**. 2020.

BARRETO, R. D. L., CORREIA, C. R. D., MUSCARÁ, M. N. "Óxido nítrico: Propriedades e potenciais usos terapêuticos", **Quimica Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046–1054, 2005. DOI: 10.1590/s0100-40422005000600020.

BASHIR, S., SHARMA, Y., ELAHI, A., et al. "Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases", **Inflammation Research**, v. 65, n. 1, p. 1–11, 2016. DOI: 10.1007/s00011-015-0874-1.

BAZON, M. L., PEREZ-RIVEROL, A., DOS SANTOS-PINTO, J. R. A., et al. "Heterologous expression, purification and immunoreactivity of the antigen 5 from *Polybia paulista* wasp venom", **Toxins**, v. 9, n. 9, 2017. DOI: 10.3390/toxins9090259.

BAZON, M. L., SILVEIRA, L., SIMIONI, P., et al. "Current Advances in Immunological Studies on the Vespidae Venom Antigen 5: Therapeutic and Prophylaxis to Hypersensitivity Responses", **Toxins**, v. 10, n. 8, p. 305, 2018. DOI: 10.3390/toxins10080305. Disponível em: http://www.mdpi.com/2072-6651/10/8/305.

BAZON, M. L. “Efeito do alérgeno Poly p 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) na modulação do fenótipo funcional de macrófagos intraperitoneais murinos” **Tese de Doutorado**, 104f. Universidade Estadual Paulista, 2021.

BENOIT, M., DESNUES, B., MEGE, J.-L. "Macrophage Polarization in Bacterial Infections", **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3733–3739, 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.181.6.3733.

BERTOLINI, T. B., DE SOUZA, A. I., GEMBRE, A. F., et al. "Genetic background affects the expansion of macrophage subsets in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected hosts", **Immunology**, v. 148, n. 1, p. 102–113, 2016. DOI: 10.1111/imm.12591.

BHATTACHARYA, P., THIRUPPATHI, M., ELSHABRAWY, H. A., et al. "GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity", **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 261–271, 2015. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.05.030. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.030.

BILÒ, B. M., RUEFF, F., MOSBECH, H., et al. "Diagnosis of Hymenoptera venom allergy", **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 60, n. 11, p. 1339–1349, 2005. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00963.x.

BILÒ, M. B. "Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: From epidemiology to treatment", **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, n. SUPPL. 95, p. 35–37, 2011. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02630.x.

BLANK, S., NEU, C., HASCHE, D., et al. "Polistes species venom is devoid of carbohydrate-based cross-reactivity and allows interference-free diagnostics", **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 1239–1242, 2013. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.10.047.

BLANK, S., BAZON, M. L., GROSCH, J., 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. DOI: 10.1007/s11882-020-00954-0.

BOLTZ-NITULESCU, G., WILTSCHKE, C., HOLZINGER, C., et al. "Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant", **Journal of Leukocyte Biology**, v. 41, n. 1, p. 83–91, 1987. DOI: 10.1002/jlb.41.1.83.

BRADFORD, M. M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.”, **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

BRANSTETTER, M. G., DANFORTH, B. N., PITTS, J. P., et al. "Phylogenomic Insights into the Evolution of Stinging Wasps and the Origins of Ants and Bees", **Current Biology**, v. 27, n. 7, p. 1019–1025, 2017. DOI: 10.1016/j.cub.2017.03.027.

CASTRO-DOPICO, T., FLEMING, A., DENNISON, T. W., et al. "GM-CSF Calibrates Macrophage Defense and Wound Healing Programs during Intestinal Infection and Inflammation", **Cell Reports**, v. 32, n. 1, 2020. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107857.

CECILIO, C. A. “Imunidade e envelhecimento: avaliação da produção de arginase e sintase do óxido nítrico por macrófagos de camundongos.” **Tese de Doutorado.** 139 f. Universidade Estadual de Campinas, 2011.

CHALAMAIAH, M., HEMALATHA, R., JYOTHIRMAYI, T., et al. "Immunomodulatory effects of protein hydrolysates from rohu (*Labeo rohita*) egg (roe) in BALB/c mice", **Food Research International**, v. 62, p. 1054–1061, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.050.

CHINETTI-GBAGUIDI, G., COLIN, S., STAELS, B. "Macrophage subsets in atherosclerosis", **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 1, p. 10–17, 2015. DOI: 10.1038/nrcardio.2014.173.

CHYUAN, I. T., LAI, J. H. "New insights into the IL-12 and IL-23: From a molecular basis to clinical application in immune-mediated inflammation and cancers", **Biochemical Pharmacology**, v. 175, n. March, p. 113928, 2020. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113928.

COLGAN, J., ROTHMAN, P. "All in the family: IL-27 suppression of TH-17 cells", **Nature Immunology**, v. 7, n. 9, p. 899–901, 2006. DOI: 10.1038/ni0906-899.

CROXFORD, A. L., KULIG, P., BECHER, B. "IL-12-and IL-23 in health and disease", **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 415–421, 2014. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.017.

DAVIS, M. J., TSANG, T. M., QIU,Y., et al. “Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection.” **mBio**, v. 4, n. 3, 2013. DOI: 10.1128/mBio.00264-13

DE GRAAF, D. C., AERTS, M., DANNEELS, E., et al. “Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy.” **Journal of Proteomics**., 2009

DEMAIN, A. L., VAISHNAV, P. "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms", **Biotechnology AdvanceS**, v. 27, p. 297–306, 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.

DEMAIN, J. G. "Insect Migration and Changes in Venom Allergy due to Climate Change", **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 41, n. 1, p. 85–95, 2021. DOI: 10.1016/j.iac.2020.09.010.

DESHMANE, S. L., KREMLEV, S., AMINI, S., et al. "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview", **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–325, 2009. DOI: 10.1089/jir.2008.0027.

DOS SANTOS-PINTO, J. R. A., DOS SANTOS, L. D., ANDRADE ARCURI, H., et al. "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, 2014. DOI: 10.1021/pr4008927.

DRAIJER, C., PETERS-GOLDEN, M. "Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: the Forgotten Cell Awakes", **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 17, n. 2, p. 6–13, 2017. DOI: 10.1007/s11882-017-0681-6.

EVANS, T., ELSTON, D. M. "What's Eating You? Vespids Revisited", **Cutis**, v. 105, p. 17–18, 2020.

EWAN, P. W. "New insight into immunological mechanisms of venom immunotherapy". **Curr Opin Allergy Clin Immunol**., v. 1, n. 4, p. 367–374, 2001.

GIBBS, G. M., ROELANTS, K., O'BRYAN, M. K. "The CAP superfamily: Cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins - Roles in reproduction, cancer, and immune defense", **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 865–897, 2008. DOI: 10.1210/er.2008-0032.

GOLDEN, D. B. K., DEMAIN, J., FREEMAN, T., et al. "Stinging insect hypersensitivity: A practice parameter update 2016", **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 118, n. 1, p. 28–54, 2017. DOI: 10.1016/j.anai.2016.10.031.

GOLDEN, D. B. K. **15 Insect Allergy**. [S.l.], Elsevier Inc., 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-37579-5.00015-5.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., et al. "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids", **Analytical Biochemistry**, 1982. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.

HENRIKSEN, A., KING, T. P., MONSALVE, R. I., et al. "Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily", **Proteins Struct. Funct. Genet**, v. 45, n. 4, p. 438-48, , 2001. DOI: 10.1002/prot.1160.

HOFFMAN, D. R. "Hymenoptera venom allergens", **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 30, n. 2, p. 109–128, 2006. DOI: 10.1385/CRIAI:30:2:109.

HOU, Y., ZHU, L., TIAN, H., et al. "IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis", **Protein and Cell**, 2018. DOI: 10.1007/s13238-018-0505-z.

IWAKURA, Y., NAKAE, S., SAIJO, S., et al. "The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens", **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 57–79, 2008. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00699.x.

JUSTO JACOMINI, D. L., CAMPOS PEREIRA, F. D., APARECIDO DOS SANTOS PINTO, J. R., 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.12.019.

JUSTO JACOMINI, D. L., GOMES MOREIRA, S. M., CAMPOS PEREIRA, F. D., et al. "Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom", **Toxicon**, v. 82, p. 104–111, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.02.016.

KAUSHIK, D. K., THOUNAOJAM, M. C., MITRA, A., 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. DOI: 10.1007/s00011-014-0738-0.

KIGERL, K. A., GENSEL, J. C., ANKENY, D. P., et al. "Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord", **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 43, p. 13435–13444, 2009. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009.

KIM, M., PARK, S. Y., JIN, M. L., et al. "Cucurbitacin B inhibits immunomodulatory function and the inflammatory response in macrophages", **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 5, p. 473–480, 2015. DOI: 10.3109/08923973.2015.1085065.

KIM, Y. S., AHN, C. B., JE, J. Y. "Anti-inflammatory action of high molecular weight *Mytilus edulis* hydrolysates fraction in LPS-induced RAW264.7 macrophage via NF-κB and MAPK pathways", **Food Chemistry**, v. 202, p. 9–14, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.114.

KING, T. P., SPANGFORT, M. D. "Structure and biology of stinging insect venom allergens.", **International archives of allergy and immunology**, v. 123, n. 2, p. 99–106, 2000. DOI: 10.1159/000024440.

KOROŠEC, P., JAKOB, T., HARB, H., et al. "Worldwide perspectives on venom allergy", **World Allergy Organization Journal**, v. 12, n. 10, 2019. DOI: 10.1016/j.waojou.2019.100067.

LEE, J. S., KIM, I. S., RYU, J. S., et al. "House dust mite, *Dermatophagoides pteronissinus* increases expression of MCP-1, IL-6, and IL-8 in human monocytic THP-1 cells", **Cytokine**, v. 42, n. 3, p. 365–371, 2008. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.03.010.

LEE, H., HALVERSON, S., MACKEY, R. "Insect Allergy", **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 43, n. 3, p. 417–431, 2016. DOI: 10.1016/j.pop.2016.04.010.

LIU, C., LI, Y., YU, J., et al. "Targeting the Shift from M1 to M2 Macrophages in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice Treated with Fasudil", **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0054841.

LOU, H., HUANG, Y., CHEN, H., et al. “M2 macrophages correlated with symptom severity and promote type 2 inflammation in allergic rhinitis.” **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2019.

LUDMAN, S. W., BOYLE, R. J. "Stinging insect allergy: Current perspectives on venom immunotherapy", **Journal of Asthma and Allergy**, v. 8, p. 75–86, 2015. DOI: 10.2147/JAA.S62288.

MACMICKING, J., XIE, Q., NATHAN, C. "Nitric Oxide and Macrophage Function", **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–350, 1997. DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00395-7.

MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., et al. “Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes”, **Immunology**, v. 23, n.11, p. 549-555, 2002.

MILLS, C. D., KINCAID, K., ALT, J. M., et al. "M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm", **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.

MILLS, Charles Dudley. "Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages", **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, p. 1–12, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00212.

MILY, A., KALSUM, S., LORETI, M. G., et al. "Polarization of m1 and m2 human monocyte-derived cells and analysis with flow cytometry upon *Mycobacterium tuberculosis* infection", **Journal of Visualized Experiments**, v. 2020, n. 163, p. 1–20, 2020. DOI: 10.3791/61807.

MONCADA, S., HIGGS, E. A. "The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology", **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. SUPPL. 1, p. 193–201, 2006. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706458.

MONSALVE, R. I., VEGA, A., MARQUÉS, L., et al. "Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: Phospholipases and antigen 5s are necessary to identify Vespula or Polistes sensitization", **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 67, n. 4, p. 528–536, 2012. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02781.x.

MULDER, R., BANETE, A., BASTA, S. "Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states", **Immunobiology**, v. 219, n. 10, p. 737–745, 2014. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.05.005.

MURRAY, P. J., ALLEN, J. E., BISWAS, S. K., et al. "Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines", **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.Macrophage.

MYLONAS, K. J., ANDERSON, J., SHELDRAKE, T. A., et al. "Granulocyte macrophage-colony stimulating factor: A key modulator of renal mononuclear phagocyte plasticity", **Immunobiology**, v. 224, n. 1, p. 60–74, 2019. DOI: 10.1016/j.imbio.2018.10.007.

NAESSENS, T., SCHEPENS, B., SMET, M., et al. “GM-CSF treatment prevents respiratory syn- cytial virus-induced pulmonary exacerbation responses in postallergic mice by stimulating alveolar macrophage maturation.” **J Allergy Clin Immunol,** v. 137, n. 3, p. 700–709, 2016. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.09.031

NAKAJIMA, T., YASUHARA, T., UZU, S., et al. "Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotrophic peptide families and their physico-chemical properties", **Peptides**, v. 6, n. SUPPL. 3, p. 425–430, 1985. DOI: 10.1016/0196-9781(85)90409-7.

NARDO, D. De, KALVAKOLANU, D. V., LATZ, E. "Immortalization of Murine Bone Marrow-Derived Macrophages", **Methods in Molecular Biology**, v. 1784, p. 169–178, 2016. DOI: 10.1007/978-4-431-55855-2_10.

NEEDLEMAN, R. K., NEYLAN, I. P., ERICKSON, T. "Potential Environmental and Ecological Effects of Global Climate Change on Venomous Terrestrial Species in the Wilderness", **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 29, n. 2, p. 226–238, 2018. DOI: 10.1016/j.wem.2017.11.004.

NEVES, E. M. dos S. F. T. "Macrófago: Biologia, Diversidade e Função", 2015. Disponível em: http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5175/1/PPG_23493.pdf.

NICOLA, N. A., HILTON, D. J., "General classes and functions of four-helix bundle cytokines". **Advances in Protein Chemistry**, v. 52., p. 55, 1998. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60431-3.

PAHL, H. L. "Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors", **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853–6866, 1999. DOI: 10.1038/sj.onc.1203239.

PALOMINO, D. C. arolin. T., MARTI, L. C. avalheir. "Chemokines and immunity", **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015. DOI: 10.1590/S1679-45082015RB3438.

PARISI, M. M. “Padronização de técnica de purificação de monócitos como modelo de cultura celular para estudo da diferenciação *in vitro* de macrófagos.” **Dissertação de mestrado.** 65 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

PENG, J., YANG, X. O., CHANG, S. H. YANG, J., DONG, C. “IL-23 signaling enhances Th2 polarization and regulates allergic airway inflammation.” **Cell Reserch Nature**, v. 128, n. 20, p. 62-71, 2010. DOI: 10.1038/cr.2009

PEREZ-RIVEROL, A., MIEHE, M., JABS, F., et al. "Venoms of Neotropical wasps lack cross-reactive carbohydrate determinants enabling reliable protein-based specific IgE determination", **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 5, p. 1917- 1919.e1, 2018. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.12.990.

PEREZ-RIVEROL, A., DOS SANTOS-PINTO, J. R. A., LASA, A. M., et al. "Wasp venomic: unravelling the toxins arsenal of P. paulista venom and its potential pharmaceutical applications", **Journal of Proteomics**, v. 161, p. 88–103, 2017.

PETERS, R. S., KROGMANN, L., MAYER, C., et al. "Evolutionary History of the Hymenoptera", **Current Biology**, v. 27, n. 7, p. 1013–1018, 2017. DOI: 10.1016/j.cub.2017.01.027.

RODRIGUES, V., FERNANDEZ, B., VERCOUTERE, A., et al. "Immunomodulatory effects of *Amblyomma variegatum* saliva on bovine cells: Characterization of cellular responses and identification of molecular determinants", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. JAN, 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00521.

ROSE-JOHN, S. “Interleukin-6 Family Cytokines”, **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v.10, n. 2, p. 1-17, 2018. DOI: 10.1101/cshperspect.a028415

SCHIENER, M., GRAESSEL, A., OLLERT, M., et al. "Allergen-specific immunotherapy of Hymenoptera venom allergy – also a matter of diagnosis", **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, n. 10, p. 1–15, 2017. DOI: 10.1080/21645515.2017.1334745.

ŠELB, J., KOGOVŠEK, R., ŠILAR, M., et al. “Improved recombinant Api m 1- and Ves v 5-based IgE testing to dissect bee and yellow jacket allergy and their correlation with the severity of the sting reaction” **Clin Exp Allergy**. v. 46, n. 4, p. 621-30, 2016. doi: 10.1111/cea.12639.

SETUBAL, S. S., PONTES, A. S., FURTADO, J. L., et al. "Effect of *Bothrops alternatus* snake venom on macrophage phagocytosis and superoxide production: Participation of protein kinase C", **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 430–441, 2011. DOI: 10.1590/S1678-91992011000400010.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., et al. "Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease", **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018. DOI: 10.1002/jcp.26429.

SHERBET, G. “Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy.” **Elsevier**, 1st ed., v. 2, , p. 115-132, 2011. eBook ISBN: 9780123878205.

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. DOI: 10.1177/0394632016678873. .

SOUZA, A. I. “Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em camundongos com capacidade diferente de elaborar resposta imune celular contra *Mycobacterium tuberculosis*”. **Dissertação de Mestrado**, 67 f, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, SP, 2014.

SPILLNER, E., BLANK, S., JAKOB, T. "Hymenoptera allergens: From venom to “venome”", **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. FEB, p. 1–9, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00077.

TAIT WOJNO, E. D., HUNTER, C. A., STUMHOFER, J. S. "The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery", **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 851–870, 2019. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.011.

TAVANO, R., SEGAT, D., GOBBO, M., 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. DOI: 10.1159/000327839.

TRZCINSKA, H., DERDOWSKI, S., KOZLOWSKI, B., et al. "Allergy to Hymenoptera venoms", **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, v. 7, n. 1, p. 13–18, 2013. DOI: 10.26444/jpccr/71427.

VINZÓN, S. E., PIRPIGNANI, M. L., NOWICKI, C., 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. DOI: 10.1016/j.pep.2010.03.029.

VOS, B., KÖHLER, J., MULLER, S., et al. “Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to Vespula venom.” **J Allergy Clin Immunol**, v. 131, p. 1225–1227, 2013. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.07.041.

XU, W., ZHAO, X., DAHA, M. R., et al. "Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages", **Molecular Immunology**, v. 53, n. 3, p. 179–186, 2013. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.07.005.

ZINGARELLI, B., HAKE, P. W., O’CONNOR, M., et al. "Absence of poly(ADP-ribose)polymerase-1 alters nuclear factor-kappa B activation and gene expression of apoptosis regulators after reperfusion injury", **Mol Med**, v. 9, n. 5, p. 143–153, 2003.

UNICAMP

CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação dos efeitos do alérgeno recombinante antígeno 5 (Poly p 5) do veneno de P. paulista, sobre a viabilidade, atividade fagocítica e liberação de mediadores inflamatórios e citocinas em macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos BALB/c**, registrada com o nº **5289-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. LUIS GUSTAVO ROMANI FERNANDES e Isabela Oliveira Sandrini Assugeni, 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 reunião de **13/06/2019**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	25/06/2019 a 10/03/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	13/06/2019 a 10/03/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/c AnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/c AnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/c AnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/c AnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	UNICAMP- CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Laboratório de Imunologia Translacional, FCM/UNICAMP

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

Campinas, **31 de julho de 2019**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosangela dos Santos
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