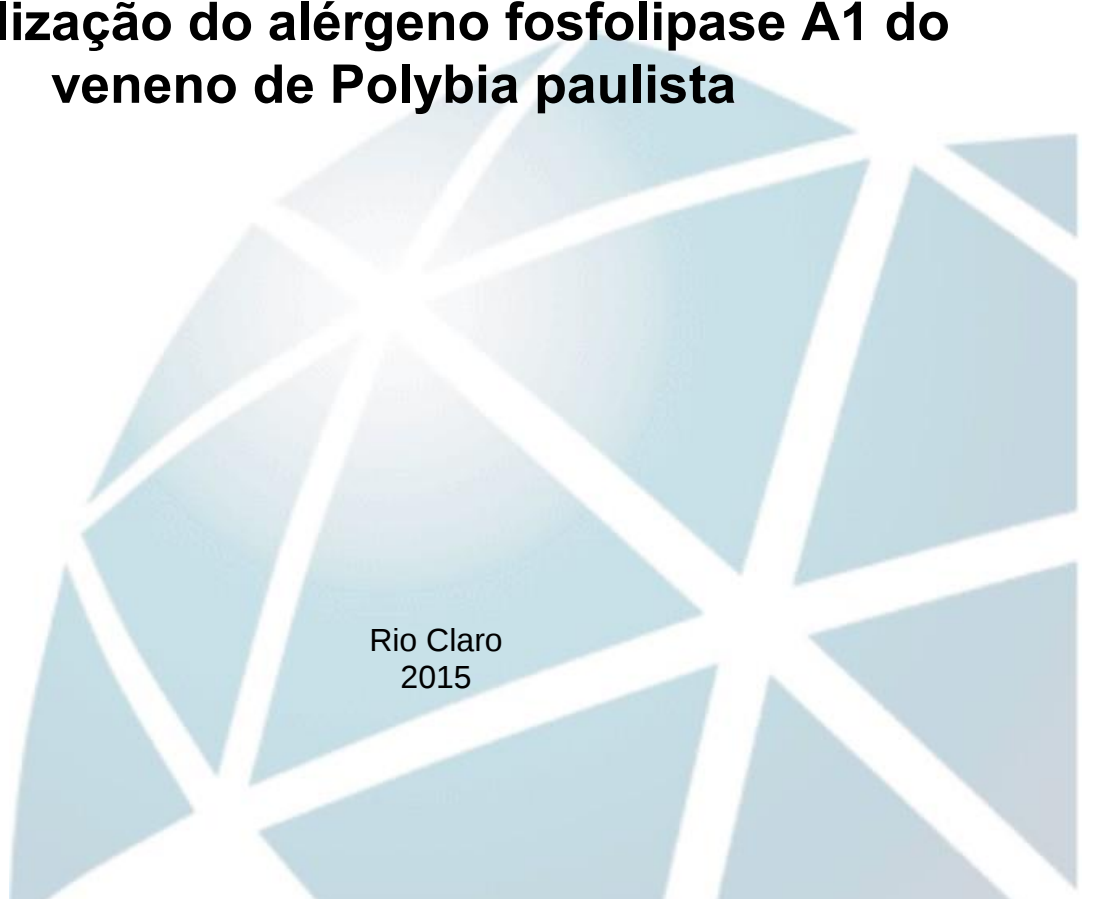

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIEL OLIVEIRA DE AZEVEDO

**Otimização dos Métodos de expressão e
solubilização do alérgeno fosfolipase A1 do
veneno de *Polybia paulista***



Rio Claro
2015

GABRIEL OLIVEIRA DE AZEVEDO

Otimização dos Métodos de expressão e solubilização do alérgeno
fosfolipase A1 do veneno de *Polybia paulista*

Orientador: Márcia R. Brochetto Braga

Co-orientador: Amilcar Perez-Riverol

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

Rio Claro
2015

Dedicatória

Eu, Gabriel Oliveira de Azevedo, dedico este trabalho à meus pais Amauri Arruda de Azevedo e Roseli Oliveira de Azevedo, a meu irmão, Gustavo Oliveira de Azevedo e a minha namorada Michele Perisatto Berreta.

A professora Márcia Regina Brochetto Braga, pelo apoio e ensinamentos, companheirismo e carinho, por ter me instruído e apoiado em todas as decisões que tomei durante a minha trajetória até aqui.

Aos meus companheiros de trabalho, Amilcar Perez Riverol e Murilo Bazon por terem sido aqueles que me ajudaram na conclusão deste trabalho, e estarem comigo todos os dias dentro do laboratório.

Aos meus sogros, Eliana e Oscar Berreta, por terem me acolhido em sua família e me tornado parte importante dela, estando sempre a disposição quando eu mais precisei.

Também a todos os colegas de curso que fizeram parte da minha vida dentro desta universidade

RESUMO

A vespa social *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) é bastante abundante e endêmica nos Estados de São Paulo e sul de Minas Gerais. Os indivíduos da espécie causam um elevado número de acidentes de importância médica. Após a ferroada a vítima pode experimentar reações imunológicas locais e/ou sistêmicas, que em alguns casos podem conduzir a anafilaxia e morte. O diagnóstico e terapia de alergia à ferroada de *P. paulista* é baseado no uso de extrato de veneno bruto o que se associa à ocorrência de reatividade cruzada e reações imunológicas adversas durante a imunoterapia. O uso de alérgenos recombinantes (r) tem-se mostrado como uma alternativa interessante para reduzir o impacto destas desvantagens. Neste trabalho, foram avaliadas diferentes condições para otimizar a expressão recombinante e solubilização dos corpúsculos de inclusão da fosfolipase A1 (*Poly p 1*) (70kDa) do veneno de *P. paulista* previamente obtida mediante expressão heteróloga no sistema procariótico, *Escherichia coli*. Os resultados aqui obtidos contribuirão para aumentar as quantidades do r *Poly p 1* necessárias para sua avaliação bioquímica e imunológica, e finalmente para melhorar os resultados do diagnóstico e imunoterapia específica de alergia ao veneno de *P. paulista*.

Palavras-chave: *Polybia paulista*, alergia, fosfolipase A1, alérgenos recombinantes, corpúsculos de inclusão, solubilização.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 ORDEM HYMENOPTERA	5
1.2 FOSFOLIPASES NO VENENO DE HYMENOPTERA	6
1.3 FOSFOLIPASES RECOMBINANTES E DIAGNÓSTICO DE ALERGIA	8
1.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>Escherichia coli</i>	9
2. OBJETIVOS	12
3. METODOLOGIA.....	13
3.1 SELEÇÃO DO CLONE DE MAIOR EXPRESSÃO	13
3.2 SDS-PAGE E DOSAGEM DE PROTEÍNAS	13
3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE rPoly p 1 NA FORMA SOLÚVEL.....	14
3.4 SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO.....	14
3.4.1 AVALIAÇÃO DOS TAMPÕES DE SOLUBILIZAÇÃO	14
3.4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE URÉIA	14
3.6 PURIFICAÇÃO DA rPoly p 1.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 SELEÇÃO DOS CLONES PARA EXPERIMENTOS DE AVALIAÇÃO	16
4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE rPoly p 1 SOLÚVEL	17
4.3. SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO DE rPoly p 1.....	18
4.4 PURIFICAÇÃO DA rPoly p 1.....	21
5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

1.1 ORDEM HYMENOPTERA

Os insetos da ordem Hymenoptera são responsáveis por uma elevada porcentagem dos acidentes relacionados a animais peçonhentos, superando em alguns países a quantidade de acidentes causados por serpentes. Segundo Charpin (1995), nos Estados Unidos a quantidade de mortes/ano relacionadas a acidentes com vespas é em média 40, enquanto que na Dinamarca a média é de 1. Além disso, estudos *post-mortem* sugerem que os dados até então obtidos em relação ao número de mortes causados por insetos himenópteros é subestimado, sendo que, em muitos casos de morte súbita ou sem causa aparente, foram encontrados altos índices de anticorpos IgE positivos para venenos de insetos (CHARPIN, D. *et al.* 1995).

Considera-se que aproximadamente 35mil espécies de Hymenoptera possuam importância clínica e dentre estas, 15 mil são da ordem Vespidae. Após ferroadas, os pacientes podem experimentar reações imunológicas locais e/ou sistêmicas, sendo as primeiras as mais comuns. Os sintomas nesse caso incluem vermelhidão aguda, inchaço dor e febre. Para estes casos, são tomadas apenas medidas de tratamentos sintomáticos para aliviar a febre e as dores. Reações sistêmicas são mais incomuns e levam a sintomas como urticária, angioedema, queda da pressão sanguínea, broncoespasmos, complicações cardiorrespiratórias, e choque anafilático. A ocorrência estimada de casos de reações sistêmicas varia de 0,3% a 8,9%, a porcentagem de reações alérgicas com ocorrência de choque anafilático varia entre 0,3% e 42,8%. Apesar dos dados a porcentagem de acidentes com consequências letais é de apenas 0,1% a 0,5% para a Europa e Estados Unidos (PEREZ-RIVEROL *et al.*, 2015).

Apesar de não existirem muitos estudos com dados consistentes sobre a taxa de ferroadas de vespas a humanos, acredita-se que entre 56% e 94% dos adultos no mundo todo já tenham sido ferroados pelo menos uma vez. A taxa de reações sistêmicas após acidentes com himenópteros é baixa, principalmente entre as pessoas que trabalham em apiários, onde em um grupo de 200 pessoas, apenas 28 apresentaram reações sistêmicas após serem ferroados. Em crianças, a taxa de ferroadas na Irlanda é de 37,5%, enquanto que em Israel é de 56,3%. A diferença no número de acidentes em diferentes regiões do globo está relacionada com a situação econômica dos países, além de outros fatores como a localização geográfica, condições climáticas e também a fauna e flora dessas regiões (PEREZ-RIVEROL *et al.*, 2015).

Os venenos das Hymenoptera sociais (abelhas, vespas, formigas) são constituídos por amins, peptídeos e proteínas de alta massa molecular, sendo na sua maioria enzimas com características alérgicas. No veneno de *P. paulista* tem sido identificado tres alérgenos majoritorios: hialuronidase, fosfolipase A1 e antígeno 5. Os efeitos citotóxicos, hemolíticos e neurotóxicos estão vinculados aos peptídeos e às amins biogênicas, enquanto a hipersensibilidade observada em pacientes alérgicos é ocasionada pelas enzimas alergênicas. (HOFFMAN, 2006). Entretanto, todos os componentes do veneno atuam sinergisticamente aumentando a atividade geral do mesmo (KOLARICH *et al.*, 2005).

1.2 FOSFOLIPASES NO VENENO DE HYMENOPTERA

As Fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfolipídios, gerando produtos bioativos, que agem como solubilizadores de membrana, cofatores enzimáticos ou como segundo mensageiro. Os fosfolipídios são construídos sobre uma cadeia de glicerol ou de esfingosina, constituinte dos esfingolipídios, que representam uma classe de lipídios de membranas celulares em que o fosfolipídio esfingomielina está incluído (RADIN, 2003).

Em eucariotos superiores, os ácidos graxos saturados e insaturados, são esterificados nas posições *sn*-1 e *sn*-2 do glicerol, respectivamente. As fosfolipases podem ser classificadas quanto à ligação clivada em seus substratos, dando origem a cinco grandes famílias: fosfolipases A1, fosfolipases A2, fosfolipases B, fosfolipases C e fosfolipases D.

Entre os alérgenos de veneno dos Hymenoptera sociais podem ser encontradas dois tipos de fosfolipases: A1 (PLA1) e A2 (PLA2).

A enzima fosfolipase A1, amplamente distribuída em diversos tecidos e organismos possui importante função fisiológica na hidrólise de glicerofosfolipídeos, além de possuir importante interesse do ponto de vista industrial, devido à produção de 2- acilfosfolipídeos de elevado valor comercial. Já os lisofosfolipídeos resultantes da ação da PLA1 possuem propriedades emulsificantes e desempenham grande importância para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos (SONG, RHEE, 2001).

As fosfolipases A2 podem ser divididas em cinco grupos principais: as Ca^{2+} dependentes - PLA2 secretórias (sPLA2), citosólicas (cPLA2), acetilhidrolases fator de agregação plaquetária (PAF-AH) e as lisossômicas, e as Ca^{2+} independentes, são todas elas divididas de acordo com o mecanismo catalítico e suas características funcionais e estruturais. As PLA2 secretórias foram subdivididas em quatorze grupos, de acordo com o número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto, sendo que as PLA2 dos venenos de

serpentes estão incluídas nos grupos I e II (SCHALOSKE, DENNIS, 2006). Essas enzimas são pequenas, com massa molecular variando de 13 a 18 kDa, e causam destruição celular pela interferência nos processos fisiológicos normais da vítima (KINI, 2003).

As fosfolipases A2 catalisam a hidrólise da posição *sn*-2 dos glicerofosfolipídeos de membrana, produzindo 1- acilfosfolipídeos e ácidos graxos livres. Quando o ácido graxo gerado é o ácido araquidônico, representa importante reação, já que este é convertido por enzimas metabólicas em vários compostos bioativos, como as prostaglandinas e os leucotrienos.

Em venenos de abelhas *Apis mellifera*, as fosfolipases A2 representam cerca de 12 % de sua composição (REISMAN et al., 1987) e são as enzimas mais ativas entre as conhecidas. As PLA2 também são encontradas nos venenos das serpentes *Naja nigricollis*, *Najana atra* e no veneno da vespa *Vespa basalis*. Por outro lado, as fosfolipases do tipo A1 são mais comuns nos venenos de vespas sociais e formigas (NAKAJIMA et al., 1985). De acordo com King et al. (2003), em veneno de vespas, a ação da fosfolipase A1, nas repostas associadas aos processos inflamatórios, é potencializada com a degranulação de mastócitos, por um mastoparano (MCD), enquanto que, em veneno de abelhas a fosfolipase A2 age em sinergismo com o peptídeo melitina (PIEK, 1985).

Santos et al., (2007) constataram a presença de PLA1 no veneno de *P. paulista*, e a caracterizaram bioquímica, funcional e estruturalmente. Demonstraram a existência de diferentes isoformas para esta enzima, indicando que a purificação de uma isoforma específica seria quase que impossível devido às similaridades bioquímicas e físico-químicas. Segundo os autores, a existência de várias isoformas pode ser um mecanismo de atribuição de diferentes funções a mesma enzima durante os envenenamentos.

As fosfolipases de veneno induzem a síntese de IgE específica e agem sinergisticamente com outras toxinas, causando efeitos farmacológicos como a hipotensão, podendo inibir a coagulação sanguínea e o aumento da permeabilidade vascular (NAKAJIMA, 1985; REISMAN et al., 1987, HO et al., 1994).

Yang et al., (2008) estudaram os efeitos da PLA1 do veneno de *Vespa magnifica* (Smith), sobre a agregação plaquetária, trombose e vaso constrição, encontrando forte agregação plaquetária em concentrações nano molares. Apenas 18 nM de PLA1 pura foram capazes de causar 85% de agregação de plaquetas em 60 segundos. Este foi o primeiro relato de que PLA1 de vespas pode induzir agregação plaquetária, uma vez que os estudos eram feitos apenas focando as atividades antialérgicas ou a atividade da PLA2.

Estudos demonstram que apesar de limitadas informações sobre a origem molecular e bioquímica das isoformas de PLA1, elas podem estar envolvidas na liberação e indução de mediadores associados às células T *helper*2, mastócitos e macrófagos e, possivelmente também a outras células apresentadoras de antígenos (KING et al., 2001). Em geral, PLA1 de venenos de vespas apresentam níveis variáveis de IgE com reatividade cruzada, sugerindo a existência de múltiplos determinantes antigênicos (KING et al., 1996).

Embora as fosfolipases de vespas e abelhas apresentem algumas similaridades estruturais, os dados da literatura demonstram que não há ocorrência de imunoreatividade cruzada, entre as PLA1 e PLA2 destes venenos. As reatividades cruzadas entre as fosfolipases de mesmo tipo (entre as PLA1 ou entre as PLA2) geralmente seguem o padrão filogenético, sendo que, evolutivamente, as famílias mais próximas apresentam maior similaridade de sequências, e assim, maior reatividade cruzada entre elas do que entre as mais distantes (HOFFMAN, 2006).

1.3 FOSFOLIPASES RECOMBINANTES E DIAGNOSTICO DE ALERGIA.

Na atualidade o diagnóstico de alergia ao veneno de Hymenoptera é baseado em testes de superfície da pele, e testes *in vitro* de detecção de IgE específico para alérgenos ou de ativação de basófilos (BILÓ et. al. 2005). O diagnóstico específico constitui um pré-requisito fundamental para o sucesso da imunoterapia. Até o momento, no Brasil, o diagnóstico é feito mediante uso de extratos de veneno bruto o que está associado à ocorrência de reatividade cruzada devido à presença, em vários alérgenos, dos carboidratos determinantes de reatividade cruzada (CCDs). A incidência de reatividade cruzada durante o diagnóstico conduz à identificação errada da espécie que causa a alergia e inclusão de venenos não representativos no desempenho da imunoterapia, o que provoca sensibilização inespecífica e reações colaterais adversas.

Os alérgenos recombinantes têm sido usados como uma estratégia muito eficiente para melhorar os resultados do diagnóstico específico de alergia resultando no desenvolvimento do diagnostico baseado em componentes definidos - do inglês: *Component Resolved Diagnosis* (CRD). Na atualidade existem vários alérgenos recombinantes já aprovados comercialmente para uso no diagnóstico. Entre eles, os mais utilizados são a fosfolipase A2 de *Apis mellifera* (*Api m* 1), o antígeno 5 (*Ves v* 5) e fosfolipase A1 de *Vespula vulgaris* (*Ves v* 1). Vários estudos publicados com variantes recombinantes destas proteínas na forma não glicosilada

permitiram detectar a ocorrência de dupla positividade e diferenciação com ocorrência de reatividade cruzada.

O uso de *Ves v 1* junto com *Api m 1*, *hialuronidase* de *A. mellifera* (*Api m 2*) e *Ves v 5*, obtidas em in *E. coli*, permitiram diferenciar a alergia a veneno de abelha e/ou de vespa em 29 pacientes alérgicos que previamente foram diagnosticados com dupla sensibilização a extrato de venenos dos dois grupos de Hymenoptera (MITTERMANN, et al. 2010). Müller et al usando *Ves v 1* junto com *rVes v 5*, e *rApi m 1* acharam que só 47% de 76 pacientes previamente identificados com dupla positividade aos extratos de veneno de *A. mellifera* e de *V. vulgaris* reagiram com os três alérgenos recombinantes (MÜLLER et al. 2012). As variantes recombinantes de *Ves v 1* e *Ves v 5* obtidas em células de insetos foram capazes de identificar 16/20 pacientes alérgicos especificamente a veneno de *V. vulgaris*, e que previamente tinham sido identificados com dupla sensibilidade (SEISMANN et al. 2009). Recentemente, os alérgenos *Ves v 1* e *Ves v 5* têm sido usados junto com os seus homólogos de *Polistes dominulus*, *Pol d 1* e *Pol d 5*, no diagnostico específico de alergia ao veneno destas espécies (MONSALVE et al. 2012).

Até o momento não existem no Brasil alérgenos recombinantes aprovados para uso no diagnostico específico de alergia ao veneno de Hymenoptera, mesmo com a grande número de espécies endêmicas que causam acidentes de importância clínica. Esta situação provoca o diagnóstico errado e compromete a segurança da imunoterapia e demonstra a necessidade de pesquisas dirigidas à obtenção destas proteínas, a fim de conseguir desenvolver sistemas de CRD e aumentar a eficiência das intervenções clínicas para o tratamento de alergia.

1.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *E. coli*

Mais de 60 alérgenos do veneno de diferentes espécies de Hymenoptera têm sido clonados, expressos (SPILLNER et al. 2014) e avaliados para seu uso no diagnóstico e imunoterapia de alergia. *E.coli* continua sendo o sistema mais comum para objetivos acadêmicos e de pesquisa, devido aos elevados níveis de expressão proteica e acúmulo rápido de biomassa, relativa facilidade de manipulação genética, e por ter um rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo (BANEYX, MUJACIC, 2004; WALSH, 2004). Adicionalmente, neste caso, a expressão usando *E.coli*, tem a vantagem de que os alérgenos produzidos não são glicosilados, evitando assim a presença dos CCDs, e potencial ocorrência de reatividade cruzada durante o diagnóstico. No entanto, a produção de alérgenos recombinantes usando *E.coli* tem dificuldades associadas à impossibilidade da bactéria de realizar modificações

pós-traducionais e formação de pontes dissulfeto devido as condições redutoras do citoplasma bacteriano. Essas características impedem em ocasiões o correto enovelamento da proteína pela formação de epitopos conformacionais que são importantes no reconhecimento do alérgeno pelo sistema imunológico. Adicionalmente, a produção de um elevado número da mesma proteína, com enovelamento incorreto provoca a formação no citoplasma bacteriano de corpúsculos de inclusão insolúveis, constituídos pela proteína heteróloga. As unidades proteicas contidas nestes corpúsculos não podem ser purificadas nem usadas para análises de função biológica e portanto, é necessário aplicar um procedimento de solubilização dos corpúsculos.

O uso de *E. coli* na expressão de alérgenos do veneno de Hymenoptera mostrou diferentes resultados em dependência das características estruturais da proteína. Uma variante de *Api m 1* expressa em *E. coli* mostrou características estruturais e um perfil imunológico semelhante à forma natural (DUDLER et al. 1992). Nesse caso, a glicosilação não representou um fator crítico para o correto enovelamento da proteína. Em contraste, a expressão heteróloga de *Api m 2* em *E. coli* produziu uma proteína com baixa atividade enzimática e baixa capacidade de união a sIgE comparada com as variantes naturais ou a forma recombinante, expressa em células de insetos (SOLDATOVA et al. 1998). Por outro lado, Skov et al. (2006) informaram que uma variante recombinante da hialuronidase de *V. vulgaris* (*Ves v 2*) obtida em *E. coli* tem níveis semelhantes de atividade enzimática que a forma natural após ré-enovelamento *in vitro* da proteína mostrando uma alternativa para recuperar a estrutura nativa dos alérgenos expressos neste sistema, e portanto, das suas características imunológicas (SKOV et al. 2006). Justo Jacomini et al. (2014) informaram que a variante recombinante da hialuronidase do veneno de *P. paulista* (*Poly p 2*), obtida usando *E. coli*, foi reconhecida por soro de pacientes alérgicos em níveis superiores aos observados para a variante natural (*nPoly p 2*). Neste caso, a proteína foi expressa na forma insolúvel, e depois foi solubilizada, mas não renaturada, mostrando que o reconhecimento neste caso ocorreu fundamentalmente mediante os epitopos sIgE lineares.

Uma variante recombinante da hialuronidase do veneno de *Solenopsis invicta* (*Sol i 2*) (LOCKWOOD et al. 2012) foi clonada e expressa em altos níveis usando culturas de *E. coli* a baixas temperaturas (16 °C). O alérgeno reconheceu sIgE de pacientes alérgicos ao veneno desta espécie.

Os problemas relacionados à glicosilação e com a presença de pontes dissulfeto na estrutura de proteínas expressas no sistema de *E. coli* podem ser enfrentados usando diferentes estratégias que permitam um enovelamento correto da proteína heteróloga. Entre elas, têm sido descritas a expressão junto a chaperonas moleculares (SORENSEN, MORTENSEN, 2005) e expressão usando vetores de direcionamento da proteína para o periplasma bacteriano, sendo que, este é um ambiente menos redutor (BERKMEN, 2012). Adicionalmente, podem ser utilizadas

estratégias que incluem mudanças nas condições de cultura como uma diminuição da concentração de indutor, da temperatura e da aeração, as quais diminuem a velocidade de produção da proteína, além dos níveis de expressão, contribuindo assim ao correto enovelamento. Ao menos um trabalho mostrou que a expressão de uma lipase, a baixas temperaturas (6 °C-10°C), previamente obtida em *E. coli* BL21 DE3 na forma insolúvel, permitiu a produção da proteína solúvel (SONG et al., 2012) e com atividade enzimática semelhante à da forma natural.

Um elevado número de proteínas heterólogas são expressas em corpúsculos de inclusão mesmo empregando as estratégias mencionadas anteriormente. No entanto, proteínas biologicamente ativas e com dobramentos corretos podem ser obtidas a partir destes corpúsculos de inclusão desde que sofram completa desnaturação e posteriormente um correto processo de renaturação. A solubilização ocorre com a ajuda de agentes desnaturantes como a ureia e o cloreto de guanidina que promovem um desdobramento completo ou parcial na estrutura proteica, a qual pode ser renaturada com a troca de tampões, diminuindo gradativamente a concentração do agente desnaturante (JEVSEVAR et al., 2005; TSUMOTO et al., 2003). É importante mencionar que as condições de temperatura e fundamentalmente de força iônica e pH, condicionam drasticamente a eficiência do processo de solubilização e que os valores ótimos podem variar entre uma e outra proteína (VEMULA et al., 2015).

2. OBJETIVOS

Otimizar a expressão recombinante e solubilização da fosfolipase A1 de veneno de *Polybia paulista* previamente obtida no Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes (LBMA-UNESP-RC), usando *E.coli*, visando sua avaliação no diagnóstico específico de alergia ao veneno da vespa. A otimização de ambas as etapas foi feita mediante:

- a) Avaliação de diferentes condições de expressão em *E.coli* (temperatura, tempo de indução e concentração do indutor) com o objetivo de obter a proteína recombinante na forma solúvel;
- b) Avaliação de diferentes tampões temperatura de solubilização, além de diferentes concentrações de agente caotrópico visando aumentar a porcentagem de rPoly p 1 solubilizada, a partir de corpúsculos de inclusão obtidos em *E.coli*, considerando-se a expressão insolúvel.
- c) Análise comparativa dos resultados da purificação de rPoly p 1 usando os sistemas comerciais IMAC Ni²⁺-NTA (Qiagen, US) e HisTrap HP (GE Healthcare, US).

3. METODOLOGIA

3.1 SELEÇÃO DO CLONE DE MAIOR EXPRESSÃO.

Para seleção do clone realizou-se a avaliação comparativa da expressão de *rPoly p 1* de quatro clones previamente obtidos no laboratório. Pré-inóculos de 5 mL de meio LB líquido contendo 30 µg/mL de canamicina foram feitos a partir de cada clone. As diferentes suspensões bacterianas foram crescidas 16 horas a 37° C sob agitação de 220 rpm. Em seguida, 3mL de cada suspensão foram inoculados em 50 mL de LB/canamicina 30 µg/mL sob agitação constante a 37°C até atingir uma densidade óptica (DO a 600 nm) de 0,4 – 0,6. Com a finalidade da seleção do clone de maior expressão, nesta etapa a expressão foi feita sob as condições anteriormente estabelecidas como as melhores: adição de IPTG 1mM (isopropil-b-D-tiogalactosídeo) (Qiagen, Cat. nº 129921), e incubação a 20°C durante 6 e 10 horas. A expressão foi avaliada mediante eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando um padrão de proteínas de massas moleculares conhecidas.

3.2 SDS-PAGE E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As análises de eletroforese da *rPoly p 1* foram realizadas por SDS-PAGE 15% (w/v) usando a metodologia descrita por Laemmli (1970) com modificações. Os géis foram corados com Azul de Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB). A concentração de proteínas presentes nos extratos de venenos e nas preparações de *rPoly p 1* foi determinada pelo método de Coomassie Blue “binding” descrita por SEDMAK e GROSSBERG (1977), utilizando-se albumina bovina como padrão. Em todas as análises, o marcador de peso molecular utilizado foi o Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers, 100kDa da GELifesciences. Code: RPN756E.

3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *rPoly p 1* NA FORMA SOLÚVEL

Para a obtenção de *rPoly p 1* solúvel foram avaliadas diferentes condições de expressão incluindo concentrações de IPTG (0,1mM, 0,5mM e 1 mM), valores de temperaturas (10°C e 20°C) e tempos de expressão 4h, 6h, 10h e 24h. O protocolo para indução é semelhante ao descrito no item 3.1

3.4 SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO.

Os corpúsculos de inclusão de *rPoly p 1* foram ressuspensos usando diferentes tampões, valores de pH e temperatura visando realizar uma avaliação comparativa dos resultados e seleção das condições ótimas de solubilização. Para a solubilização, os *pellets* obtidos após indução foram lavados usando os diferentes tampões de solubilização sem ureia. Após lavagem, os *pellets* foram ressuspensos usando os tampões com ureia 8M e incubados sob agitação (180 rpm), em diferentes temperaturas. Após a solubilização, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 8000 rpm, para separar o *pellet* do sobrenadante. As duas frações foram posteriormente analisadas mediante SDS-PAGE.

3.4.1 AVALIAÇÃO DOS TAMPÕES DE SOLUBILIZAÇÃO

Para a avaliação da composição e pH, foram utilizados os seguintes tampões:

1. Tampão citrato-fostato (0,1M ácido cítrico e 0,2M fosfato de sódio bibásico, pH=2.6);
2. Tampão Tris-HCl (0,1 M Tris, 0,1 M ácido clorídrico, NaCl 150 mM, ureia 2-8M, pH=7.0)
3. Tampão fosfato (0,1M fosfato monobásico de sódio, 0,1M fosfato bibásico de sódio; NaCl 150 mM, ureia 2-8M, pH=8,0).
4. Tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M carbonato de sódio, 0,1M bicarbonato de sódio, NaCl 150 mM, ureia 2-8M, pH=10,2)

3.4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE UREIA

Para testar o efeito da temperatura, os corpúsculos de inclusão foram solubilizados usando cada um dos tampões descritos na seção anterior a 8 °C (overnight) e 25 °C (quatro horas). O efeito de concentração do agente caotrópico foi avaliado após seleção do tampão e temperatura ótima para solubilização, usando ureia 2M, 3M, 4M, 5M, 6M e 8M. As frações solúveis e insolúveis foram separadas e avaliadas mediante SDS-PAGE.

3.5- PURIFICAÇÃO DA *rPoly p 1*

Para a purificação do alérgeno recombinante foram usados os sistemas comerciais HisTrap HP (GE Healthcare, US) 5X 1mL e IMAC Ni²⁺-NTA (Qiagen, USA), seguindo em cada caso as indicações do fabricante. Para a purificação, usando ambos os sistemas, as amostras foram passadas por colunas Amicon Ultra 15 mL, 10 000 NMWL (EMD Millipore, USA) para troca do tampão. Finalmente foi realizada uma análise comparativa dos resultados da purificação usando cada sistema.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DOS CLONES PARA EXPERIMENTOS DE AVALIAÇÃO

Dos quatro clones usados na avaliação para seleção do melhor deles, o clone 4 mostrou os maiores níveis de expressão de *rPoly p 1* (Figura 1, Tabela 1) sendo 10 horas o tempo ótimo de indução. Tempos superiores não aumentam os níveis de proteína expressa (não mostrado).

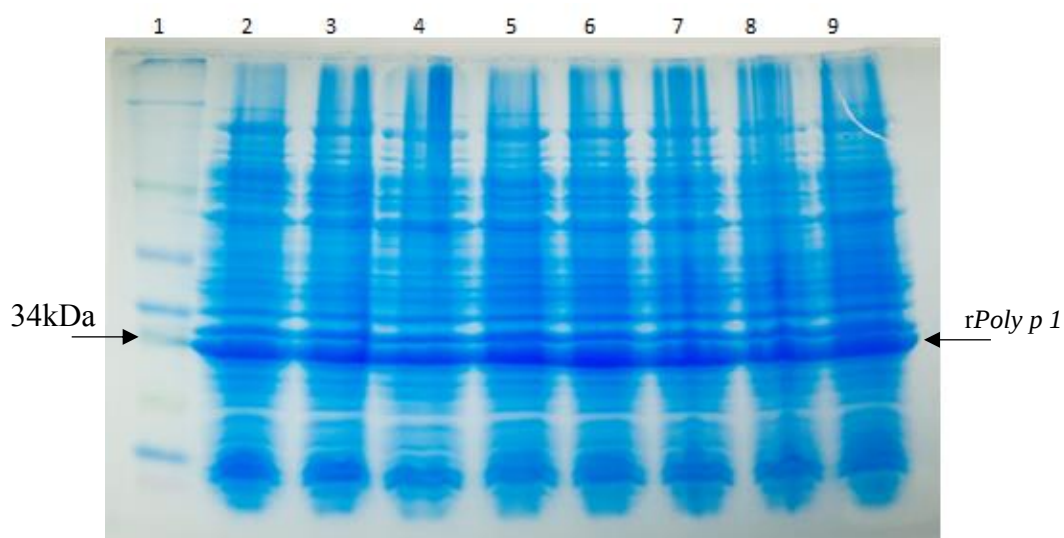


Figura 1. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (15%) dos *pellets* dos clones de *E.coli*. 1. Marcador de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers, 100kDa. Code: RPN756E), 2-3: clone 1 (6 e 10 horas pós indução, p.i.), 4-5: clone 2 (6 e 10 horas p.i.), 6-7: clone 3 (6 e 10 horas p.i.), 8-9: clone 4 (6 e 10 horas p.i.).

Tabela 2: Resultados da quantificação de proteínas totais após expressão com os diferentes clones de *E.coli* BL21 DE3 transformados com pET-28a contendo a sequência de *rPoly p 1*.

CLONE nº	TEMPO APÓS INDUÇÃO (h)	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (g/L)
1	6	3.9
	10	4.3
2	6	3.6
	10	4.1
3	6	3.8
	10	4.4
4	6	3.7
	10	4.7

4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE rPoly p 1 SOLÚVEL

A tentativas de obtenção de rPoly p 1 na forma solúvel mediante mudança de duas condições de indução, não mostrou resultados positivos. Tanto no caso da expressão a 20 °C, a diferentes concentrações de IPTG (Figura 2), como no caso da expressão a baixa temperatura (10°C) (Figura 3) usando as mesmas concentrações de indutor, as proteínas foram obtidas em corpúsculos de inclusão. Desta forma, a proteína foi obtida em corpúsculos de inclusão em todos os casos.

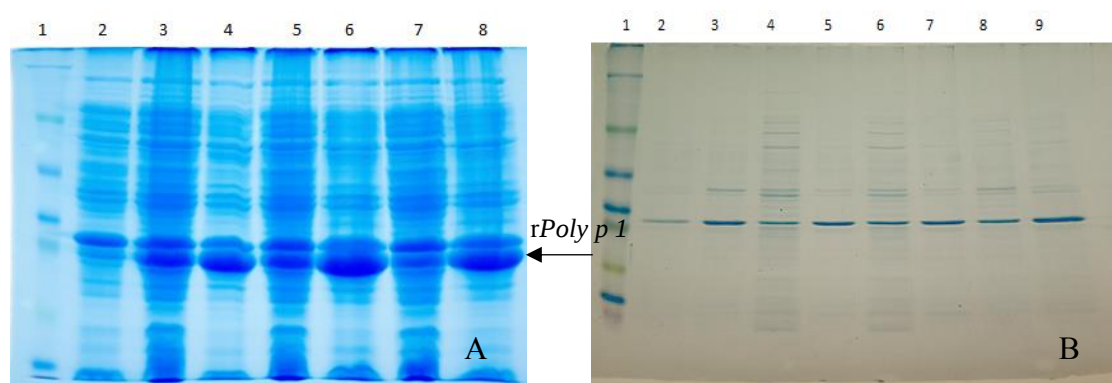


Figura 2. Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE (15%) dos *pellets* (A) e sobrenadantes (B) resultantes da expressão de rPoly p 1 a 20 °C e em diferentes concentrações de IPTG. 1- Marcador de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers, 100kDa. Code: RPN756E), A: 2. Controle negativo da expressão (rPoly p 1), 3-4: 0,1 mM (8 e 24 horas p.i) , 5-6: 1 mM (8 e 24 horas p.i) , 7-8: 0,5 mM (8 e 24 horas p.i). B: 2-3 controle negativo da expressão, 4-5: 0,1 mM (8 e 24 horas p.i), 6-7: 0,5 mM (8 e 24 horas p.i), 8-9: 0,1 mM (8 e 24 horas p.i).

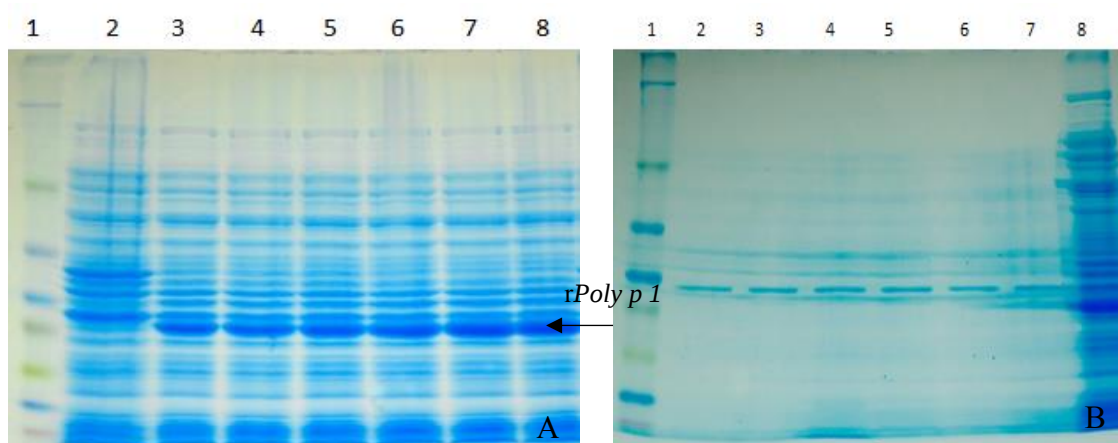


Figura 3. Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE (15%) dos *pellets* (A) e sobrenadantes (B) resultantes da expressão de rPoly p 1 a 10 °C e em diferentes concentrações de IPTG. 1- Marcador de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers, 100kDa. Code: RPN756E), A: 2. Controle negativo da expressão (rPoly p 1), 3-4: 0,1 mM (8 e 24 horas p.i) , 5-6: 1 mM (8 e 24 horas p.i) , 7-8: 0,5 mM (8 e 24 horas p.i). B: 2-3: 0,1 mM (8 e 24 horas p.i), 4-5: 0,5 mM (8 e 24 horas p.i), 6-7: 0,5mM (8 e 24 horas p.i), 8: Controle de expressão (rPoly p 1),

O alérgeno *Poly p 1* tinha sido expresso no nosso laboratório, usando como condições de expressão ótimas uma concentração de IPTG de 1M, e 20 ° C (PEREIRA, 2011). No entanto, *rPoly p 1* foi obtida em todos os casos na forma insolúvel impossibilitando sua purificação e uso na imunização e avaliações imunológicas. A produção de proteínas recombinantes usando o sistema procariótico *E. coli* tem as desvantagens de que não ocorrem modificações pós-traducionais na proteína expressa e que, o citoplasma da bactéria é um ambiente fortemente redutor, evitando assim a formação de pontes dissulfeto. Estudos de proteômica demonstraram que *Poly p 1* possui ao menos 13 cisteínas na sequência primária e que delas, 12 estão potencialmente envolvidas em formação de pontes dissulfeto (SANTOS et al. 2007). Sendo assim, a expressão de *Poly p 1* na forma solúvel, no citoplasma de *E.coli* está comprometida pela ausência destas pontes, que são impedidas de serem formadas. Em consequência, ocorre o impedimento do correto enovelamento do alérgeno recombinante causando que seja expresso como corpúsculos de inclusão.

Vários autores já demonstraram que a diminuição da concentração do indutor, bem como da temperatura, durante a produção de proteínas heterólogas, conduz à expressão solúvel, mesmo que em baixos níveis. Num trabalho recente SONG et al., 2012 demonstraram que a expressão no intervalo de temperatura de 6 a 10°C permitiu a produção de uma lipase na forma solúvel, que previamente tenha sido obtida como uma proteína insolúvel. Nossa tentativa de expressão solúvel de *rPoly p 1* não demonstrou o mesmo resultado, possivelmente devido à presença das seis pontes dissulfeto presentes na sua estrutura. Uma alternativa para tentar variar este resultado poderia ser a expressão com concentrações de IPTG ainda menores (0,05mM, 0,01mM, 0,005mM) que tem sido proposta como os limites para a tentativa de expressão solúvel em proteínas recombinantes previamente expressas em corpúsculos de inclusão. O problema dessa estratégia é que se produz uma significativa diminuição dos níveis de proteína expressa, fator crítico para a realização dos ensaios de avaliação imunológico dos alérgenos. Entre outras alternativas, que já estão sendo aplicadas no laboratório está a expressão de *rPoly p 1* usando o sistema eucariótico de *Pichia pastoris*, no qual é possível a formação de pontes dissulfeto e assim, a expressão solúvel deste tipo de proteínas (BORODINA, et al. 2011).

4.3. SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPUSCULOS DE INCLUSÃO DE *rPoly p 1*

Considerando os resultados da tentativa de expressão na forma solúvel de *rPoly p 1*, a próxima etapa deste trabalho foi direcionada a otimizar os resultados obtidos previamente na

solubilização dos corpúsculos de inclusão do alérgeno recombinante. Inicialmente foi realizado uma análise *in silico* para a determinação do ponto isoelétrico (pI) teórico da proteína heteróloga. A determinação mostrou um valor de pI=9,0 (n+/- 0.1). Considerando esse valor, foram selecionados tampões com pH superiores (10,6), inferiores em duas ordens de grandeza (pH=7,0) e superior a duas ordens (pH=2,6). Adicionalmente, foi realizada a solubilização com o tampão que foi usado previamente (fosfato, pH=8,0) afim de realizar as análises comparativas.

Os resultados da solubilização usando os diferentes tampões mostraram que os maiores níveis de rPoly p 1 - solubilizada a 25 °C e 8M ureia - foram obtidos com o tampão citrato-fosfato (pH=2,6), seguido dos tampões Tris-HCl (pH=7,0), carbonato-bicarbonato (pH=10,2) e finalmente pelo tampão testado usado inicialmente, fosfato de sódio (pH=8,0) (Figura 4).

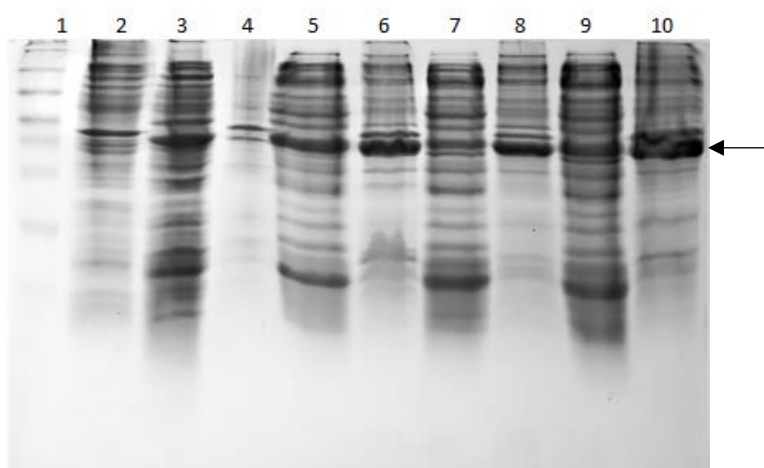


Figura 4. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (15%) da solubilização dos corpúsculos de inclusão de rPoly p 1 usando diferentes tampões e ureia 8M. (1) Marcador de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers, 100kDa. Code: RPN756E), (2) Controle negativo da indução. (3) fração solúvel e (4) fração insolúvel da solubilização em tampão citrato-fosfato (pH=2,6); (5) fração solúvel e (6) fração insolúvel com tampão Tris-HCl (pH=7,0); (7) fração solúvel e (8) fração insolúvel com tampão fosfato (pH=8,0); (9) fração solúvel e (10) fração insolúvel usando tampão carbonato-bicarbonato (pH=10,2)

A influência da temperatura durante a solubilização também foi avaliada usando as condições testadas inicialmente: 4 °C durante toda a noite e 25 °C por 4 horas. As análises dos resultados mostram que o aumento da temperatura (25 °C) condiz com um aumento dos níveis de rPoly p 1 solúvel (Figura 5). Adicionalmente, este resultado permite diminuir o tempo necessário para a produção do alérgeno. Esse resultado coincide com trabalhos anteriores que informaram que o aumento na temperatura de solubilização até valores inferiores a 30 °C

produzem aumento na eficiência de solubilização de corpúsculos de inclusão (ASHOK et al. 2000).

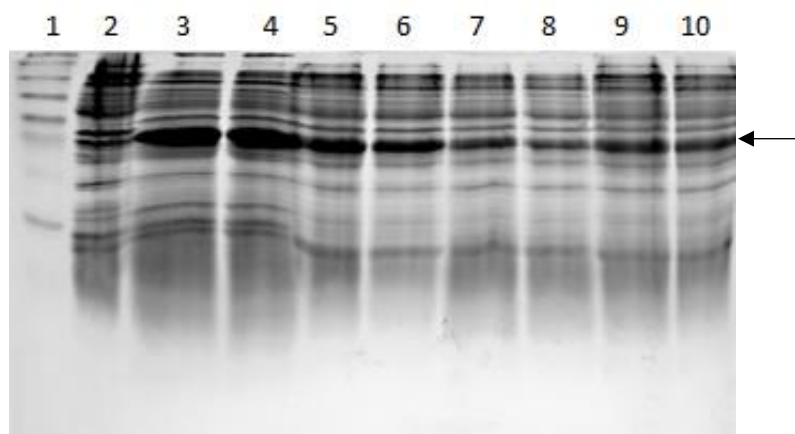


Figura 5. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (15%) da solubilização dos corpúsculos de inclusão de *rPoly p 1* usando diferentes tampões, presença de ureia a 8M e temperaturas de 25 °C e 4 °C. (1) Marcador de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers, 100kDa. Code: RPN756E), (2) Controle negativo da indução. Solubilização com tampão citrato-fosfato (pH=2,6): (3) 25°C e (4) 4°C; Tris-HCl (pH=7,0): (5) 25°C e (6) 4°C, fosfato (pH=8,0): (7) 25°C e (8) 4°C e carbonato-bicarbonato (pH=10,2): (9) 25°C e (10) 4°C.

As análises de eficiência de solubilização a diferentes concentrações de ureia mostraram que os corpúsculos de inclusão de *rPoly p 1* são solubilizados totalmente usando tampão citrato-fosfato (pH=2,6) a 25°C e 6M de ureia (Figura 5). O resultado é diferente do informado previamente para a solubilização de *rPoly p 1* em tampão fosfato (pH=8,0) a 4 °C, porque não foi possível solubilizar toda a proteína usando 8M ureia. Este resultado é importante porque permite usar uma menor concentração deste reagente, facilitando sua eliminação mediante dialises no momento da imunização dos animais para realizar os ensaios imunológicos.

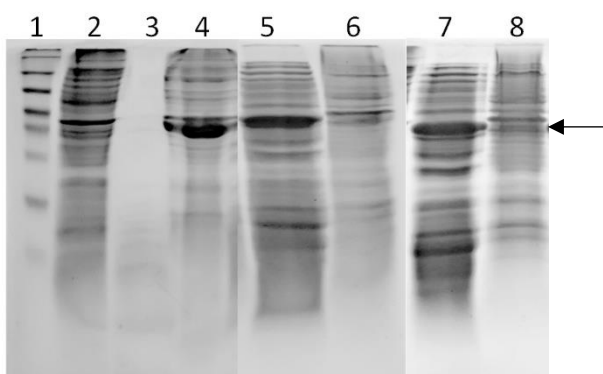


Figura 6. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (15%) da solubilização dos corpúsculos de inclusão de *rPoly p 1* em tampão citrato-fosfato, temperatura de 25 °C e diferentes concentrações de ureia. (1) Marcador de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers,

100kDa. Code: RPN756E), (2) Controle negativo da indução; (3) fração solúvel e (4) fração insolúvel com ureia a 3M; (5) fração solúvel e (6) fração insolúvel com ureia a 5M; (7) fração solúvel e (8) fração insolúvel com ureia a 6M,

Adicionalmente este resultado permitiu realizar um procedimento preliminar de eliminação de proteínas contaminantes, visto que, usando concentração de ureia a 4M é possível solubilizar uma grande quantidade de proteínas de *E.coli* BL21 DE3, as quais são descartadas antes de realizar a solubilização final usando ureia 6M. A Tabela 2 mostra um resumo comparativo dos resultados obtidos no processo de otimização da solubilização de corpúsculos de inclusão de *rPoly p 1*.

Tabela 2: Resultados da quantificação de proteínas totais nas diferentes condições analisadas para obtenção da *rPoly p 1* solubilizada.

TAMPAO/pH	TEMPERATURA °C	CONCENTRAÇÃO DE UREIA (M)	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (FRAÇÃO SOLÚVEL) (g/L)
citrato-fosfato (pH=2,6):	4	6	3,1
	25	6	3,4
Tris-HCl (pH=7,0)	4	8	2,9
	25	8	3,1
**Fosfato/Na (pH=8,0):	**4	8	1,8
	25	8	2,1
carbonato-bicarbonato (pH=10,2):	4	8	2,7
	25	8	3,0

**Condições de referência usadas no experimento inicial de solubilização

4.4 PURIFICAÇÃO DA *rPoly p 1*

Para a purificação da *rPoly p 1* solubilizada foram usados os sistemas comerciais referidos na seção 3.5, segundo as indicações do fabricante em cada caso. Para a purificação foram empregadas as amostras solubilizadas em tampão citrato-fosfato (pH=2,6), ureia 6M, a 25 °C, que representam as condições ótimas de solubilização, segundo os resultados descritos

na Tabela 2. Antes da etapa de purificação, foi realizada a troca do tampão, usando o sistema de colunas Amicon Ultra 15 mL, 10 000 NMWL (EMD Millipore, USA) a fim de colocar as amostras em tampão compatível com a resina das colunas de purificação.

As análises dos resultados mostraram que o uso da resina comercial IMAC Ni²⁺-NTA (Qiagen, US) levaram à purificação parcial de *rPoly p 1*, sendo observado a presença de proteínas contaminantes do proteoma de *E.coli* BL21 DE3 na fração de eluição final (Figura 7A). Por outro lado, o uso do sistema HisTrap HP (GE Healthcare, US) permitiu a purificação total de *rPoly p 1* (Figura 7B) mostrando uma banda única correspondente ao alérgeno recombinante. Os valores de concentração de *rPoly p 1* após purificação com cada sistema estão resumidos na tabela 3.

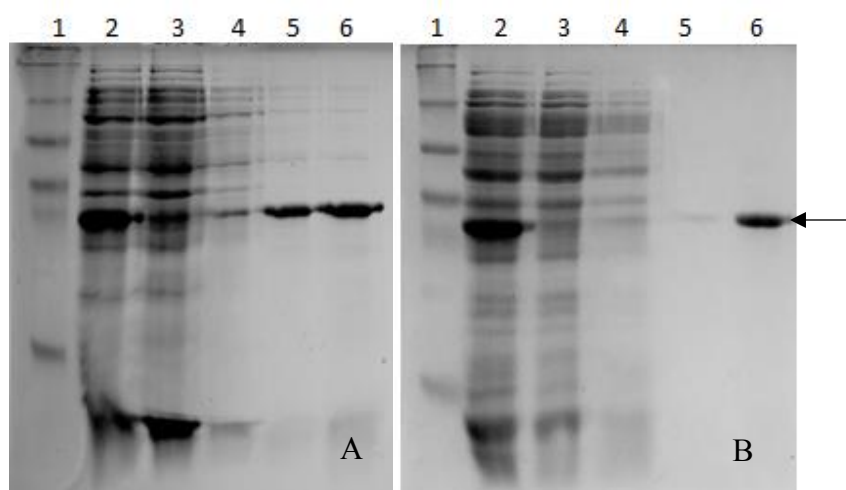


Figura 7: Purificação de *rPoly p 1*. (A) IMAC Ni²⁺-NTA e (B) HisTrap HP. (1) Marcador de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers, 100kDa. Code: RPN756E); (2) extrato após solubilização; (3) Volume morto da coluna; (4) Lavagem com imidazol 50mM; (5) Lavagem com imidazol 75 mM; (6) eluição com imidazol 200mM. Observar a presença de bandas contaminantes na região de alta massa molecular em (A) e ausência destas em (B).

Como se observa na Figura 7 a coluna pré-empacotada do sistema HisTrap HP (GE Healthcare, US) mostrou-se mais eficiente na ligação específica da *rPoly p 1* do que a resina IMAC Ni²⁺-NTA (Qiagen, US). Parte do alérgeno recombinante não interage com a resina (Figura 7A, 3) diminuindo a quantidade de proteína obtida na fração da eluição final (imidazol 200mM). Adicionalmente, a ligação de *rPoly p 1* é mais fraca do que no caso do sistema HisTrap HP, sendo que na lavagem com imidazol 75 mM, foram eluídos 40% da proteína recombinante. No caso do sistema HisTrap HP, toda a proteína recombinante expressa interagiu com a coluna (Figura 7B, 3) e praticamente não se observou eluição de

proteína antes da etapa final (200mM). Isto permitiu obter um maior rendimento nos níveis de *rPoly p 1* solúvel purificada (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da quantificação de *rPoly p 1* após purificação, usando dois sistemas cromatográficos comerciais.

SISTEMA	CONCENTRACAO DE <i>rPoly p 1</i> (mg/L)
IMAC Ni ²⁺ -NTA (Qiagen, US)	100
HisTrap HP (GE Healthcare, US)	340

5. CONCLUSÕES

1. A diminuição das concentrações de IPTG (0,1 mM e 0,5 mM) e da temperatura durante a expressão de rPoly p 1 (70 kDa) Em *E.coli* não conduziu à produção do alérgeno na forma solúvel.
2. A solubilização de rPoly p 1 usando tampão citrato-fosfato (pH=2,6), ureia 6M e temperatura de 25 °C permitiu um aumento significativo na produção do alérgeno solubilizado em relação às condições usadas anteriormente no laboratório.
3. O uso do sistema HisTrap HP (GE Healthcare, US) permitiu a purificação total da rPoly p 1 sendo este resultado superior ao obtido com a resina IMAC Ni²⁺-NTA, com a qual, que foi obtida só a purificação parcial do alérgeno.
4. Os resultados descritos permitiram aumentar a disponibilidade de rPoly p 1 solúvel e purificada, um requisito necessário para e os ensaios de avaliação imunológica e finalmente o uso deste alérgeno recombinante no diagnóstico de alergia ao veneno de *P. paulista*.

6. REFERÊNCIAS

- ASHOK K. PATRA, R. MUKHOPADHYAY, R. MUKHIJA, ANUJA KRISHNAN, L. C. GARG, AND AMULYA K. PANDA. Optimization of Inclusion Body Solubilization and Renaturation of Recombinant Human Growth Hormone from *Escherichia coli* Product Development Cell. **Protein Expression and Purification** 18, 182–192 (2000).
- BANEYX, F., MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia Coli*. **Nat Biotechnol.** v. 22, n. 11, p. 1399-408. 2004
- BARNARD, J. H. Studies of 400 Hymenoptera sting deaths in the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.**, v. 52, p. 257-264, 1973.
- BERKMEN, M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.82, p.240–251, 2012.
- BILÓ, B. M.; RUEFF, F.; MOSBECH, H.; BONIFAZZI, F.; OUDE-ELBERINK, J. N. G. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. **Allergy.** v. 60, p. 1339-1349, 2005.
- BORODINA, I.; JENSEN, B.M.; WAGNER, T.; HACHEM, M.A.; SØNDERGAARD I, POULSEN, L.K. Expression of Enzymatically Inactive Wasp Venom Phospholipase A1 in *Pichia pastoris*. **PLoS ONE** 6(6): e21267, 2011.
- BOUSQUET, J.; HUCHARD, G.; MICHEL, F.B. Toxic reactions induced by Hymenoptera venom. **Ann. Allergy**, v. 52, p. 371-374, 1984.
- BOUSQUET, J., MENARDO, J. L., AZNAR, R. *et al.* Clinical and immunologic survey in beekeepers in relation to their sensitization. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 73 (1984), pp. 332–340
- CARDOSO, J. L. C. *et al.* Animais peçonhentos no Brasil-biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, 468 p, 2003.

CASTRO, F. F. M. Reações alérgicas por venenos de Hymenoptera: experiência de 20 anos. Tese (Livre-Docência - Disciplina de Alergia e Imunopatologia) – **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 132 p, 2001.

CHALMERS JJ, KIM E, TELFORD JN, WONG EY, TACON WC, SHULER ML, ET AL. Effect of temperature on *Escherichia Coli* overproducing β -lactamase or human epidermal growth factor. **Appl Environ Microbiol.** v. 56, n. 1, p. 104-11. 1990.

CHARPIN, D., BIRNBAUN, J., VERVLOET, D., Epidemiology of hymenoptera allergy. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, 1995. p. 396-402.

CHOI J, KEUM K, LEE S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science.** v. 61, p. 876-885. 2006.

DILL, K.A., SHORTLE, D. Denatured states of proteins. **Annual Review of Biochemistry.** v. 60, p. 795-825, 1991.

DITIMAS, E. HIDER, R. C. Honey Bee venom. **Bee Word.** V. 68, p. 51-71, 1987.

DUDLER, T.; CHEN, W.Q.; WANG, S.; SCHNEIDER, T.; ANNANA, R.R.; DEMPCY, R.O.; CRAMERI, R.; GMACHL, M.; SUTER, M.; GELB, M.H. High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2. **Biochimica et Biophysica Acta** **1992**, 1165, 201–210.

ERZEN, R.; KOROSK, P.; SILAR, M.; MUSIC, E.; KOSNIK, M. Carbohydrate epitopes as a cause of cross-reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom. **Wien Klin Wochenschr** . v. 121, p. 349–352. 2009.

GOLDEN, D. B.; MARSH, D. G.; FREIDHOFF, L. R.; Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.**, v. **100**, p. 760-766, 1997.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. Electrophoresis of proteins. 2 ed. New York: [s.n], 1990. 383 p.

HEINIG, J.H.; ENGEL, T.; WEEKE, E.R. Allergy to venom from bee or wasp: the relation between clinical and immunological reactions to insects stings. **Clinical Allergy**, v. 18, p. 71-78, 1988.

HOFFMAN, D.R. Allergens in Hymenoptera venoms. Identification of allergen B of bee venom acid fosfatase. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 59, p. 364-366, 1977.

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

HOFFMAN, DR.; JACOBSON, R.S Allergens In Hymenoptera venom venom. XXVII: bumblebee venom allergy and allergens. **Journal of allergy and clinical Immunology**, Saint Louis, v. 97, p. 812-821, 1996.

JAMES, L. C.; ROVERSI, P.; TAWFIK, D. S. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. **Science**. v. 299, p. 1362-1367. 2003

JEVSEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA I, PODOBNIK B, GRDADOLNIK J, MENART V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology Progress**. v. 21, n. 2, p. 632-9. 2005.

KING, T. P., JIM, S.Y, MONSALVE, R.I., KAGEY-SOBOTKA, A., LICHTENSTEIN, L.M., SPANGFORT, M.D. Recombinant Allergens with Reduced Allergenicity but Retaining Immunogenicity of the Natural Allergens: Hybrids of Yellow Jacket and Paper Wasp Venom Allergen Antigen 5. **The Journal of Immunology**. v. 166, p. 6057–6065, 2001.

KING, T.P.; LU, G.; GOZALEZ, M.; QIAN, N.F.; SOLDATOVA, L. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic-cross reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**., v.98, p. 588-600, 1996.

KINI, R.M; Excitement ahead: Structure, function and mechanism as snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

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

KOLECKI, P. Delayed toxic reaction following massive bee envenomation. **Annals of Emergency Medicine**. v. 33, p. 114-116. 1999.

KUDO. I. Diversity of phospholipase A2 enzymes; foreword, **Biological e Phamaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1157, 2004.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259): 680-685.

LIMA, P. R. M. DE; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Caracterização de serinaproteases em venenos de diferentes subespécies de *Apis mellifera* (Hymenoptera-Apidae). **VI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Guaratinguetá – SP, Resumos: pp 135, 1994.

LOCKWOOD, S.A.; HAGHI POUR-PEASLEY, J.; HOFFMAN, D.R.; DESLIPPE, R.J. Identification, expression, and immuno-reactivity of *Sol i 2* & *Sol i 4* venom proteins of queen red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). **Toxicon** 2012, 60, 752–759.

MANZOLI-PALMA, M.F.; PALMA, M.S. Aspectos entomológicos das alergias provocadas por ferroadas de Hymenoptera sociais. **ASBAI**, v. 15, n. 4, p. 123-125, 1992.

MAURIELLO, P., M. BARDE, S. H., GEORGITIS, J. W., RÉOMAN, R. E., Natural history of large local reactions from stinging insects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 74, 1984, pp. 494–498

McNAIRY, M.M.; GASTMEYER, J.; PANTERA, B.; HOFFMAN, D.R. Isolation of paper wasp venom proteases by affinity chromatography. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.105, p.S57, 2000.

MITTERMANN, I.; ZIDARN, M.; SILAR, M.; MARKOVIC-HOUSLEY, Z.; ABERER, W.; KOROŠEC, P.; KOŠNIK, M.; VALENTA, R. Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish honeybee and wasp allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2010, 125, 1300–1307.

MONSALVE, R.I.; VEJA, A.; MARQUES, L.; MIRANDA, A.; FERNANDEZ, J.; SORIANO, V.; CRUZ, S.; DOMÍNGUEZ-NOCHE, C.; SÁNCHEZ-MORILLAS, L.; ARMISEN-GIL, M.; *et al.* Component-resolved diagnosis of vespoid venom-allergic individuals: Phospholipases and antigen 5 are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization. **Allergy**. 2012, 67, 528–536

MOSBECH, H; MULLER, U. Side-effects of insect venom immunotherapy: results from an EAACI multicenter study. **Allergy**. v. 55, p. 1005-1010, 2000

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

MÜLLER, U.R.; SCHMID-GRENDELMEIER, P.; HAUSMANN, O.; HELBLING, A. IgE to recombinant allergens *api m 1*, *ves v 1*, and *ves v 5* distinguish double sensitization from cross reaction in venom allergy. **Allergy** 2012, 67, 1069–1073.

MULLER, U. R.; SOLDATOVA, L.; WEBER, M. Bee venom allergy: Comparison of IgE-binding capacity of purified natural and recombinant-synthetic venom allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.101, p.33. 1998.

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

MURAKAMI, M. Hot topics in phospholipase A2 field. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1179-1182, 2004.

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

NELSON, D. L.; COX M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed , Artmed, 2011. 1304p.

OZDEMIR, C.; KUCUKSEZER, U. C.; AKDIS, M.; AKDIS C. A. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. **Clinical et Experimental Allergy**. v. 41, p.1226-1234. 2011.

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

PEREIRA, F. D. C., Caracterização molecular e expressão heteróloga do alérgeno fosfolipase a1 do veneno de *Polybia paulista*. **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**. 2011.

PEREZ-RIVEROL, A.; JUSTO-JACOMINI, D.L.; ZOLLNER, R. L.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Facing Hymenoptera Venom Allergy: From Natural to Recombinant Allergens. **Toxins**, v. 7, p. 2551-2570, 2015.

SANTOS, L. D. Análise proteômica dos alérgenos imunodominantes do veneno da vespa *Polybia paulista*. 2007. 197f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular) - **Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista**.

SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; SOUZA, B. M.; ARCURI, H. A.; CUNHA-NETO, E.; CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Purification, Sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**, v. 50, p. 923-937, 2007.

SANTOS, L. D.; MENEGASSO, A. R.; SANTOS PINTO, J. R.; SANTOS, K. S.; CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Proteomics**. v. 11, p. 1403-1412. 2011.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCHMIDT, J.O. Biochemistry of insect venoms. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 27, p. 339-368, 1982.

SEDMAN, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. **Analytical Biochemistry**, v.79, p.544-552, 1977.

SEISMANN, H.; BLANK, S.; CIFUENTES, L.; BRAREN, I.; BREDEHORST, R.; GRUNWALD, T.; OLLERT, M.; SPILLNER, E. Research Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity. **Clinical and molecular allergy**, 8:7, 2010.

SEISMANN, H.; BLANK, S.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; CIFUENTES, L.; GRUNWALD, T.; BREDEHORST, R.; OLLERT, M.; SPILLNER, E. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of α -1,3-core fucosylation. **Molecular Immunology**. 2009, 47, 799–808.

SINGH, S. M.; PANDA, A.K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 99, n. 4,p. 303–310, 2005.

SKOV, L.K.; SEPPALA, U.; COEN, J.J.F.; CRICKMORE, N.; KING, T.P.; MONSALVE, R.; KASTRUP, J.S.; SPANGFORT, M.D.; GAJHEDE, M. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 angstrom resolution: Structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. **Acta Crystallographica D. Biological Crystallography**. 2006, 62, 595–604.

SOLDATOVA, L. N.; CRAMERI, R.; GMACHL, M.; KEMENY, D. M., SCHMIDT, M.; WEBER, M. et al.Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen

hyaluronidase expressed in baculovirus- infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 101, p. 691–698. 1998.

SONG, J.K; RHEE J.S. Enhancement of stability and activity of phospholipase A1 in organic solvents by directed evolution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1547, p.370-378, 2001.

SONG, J.M.; AN, Y.J.; KANG, M. H.; LEE, Y.H.; CHA, S.S. Cultivation at 6–10 °C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.82, p.297–301, 2012.

SORENSEN HP, MORTENSEN KK. Soluble expression of recombinant protein in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**. v. 4, n. 1, p. 1-8. 2005

SOUZA, B., M. Peptídeos policatiônicos do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Polistinae): estrutura e função. Rio Claro, 2002. 120p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Unesp**.

SPELLNER, E.; BLANK, S.; JAKOB, T. Hymenoptera allergens: From venom to “venome”. **Frontiers in Immunology**. 2014, doi:10.3389/fimmu.2014.00077.

STURM, G; KRANKE, B; RUDOLPH, C; ABERER, W. Rush Hymenoptera venom immunotherapy: A safe and practical protocol for high-risk patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 110, p. 928-933, 2002.

TSUMOTO K, EJIMA D, KUMAGAI I, ARAKAWA T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**. V. 28, n.1, p. 1-8. 2003.

VARALDA, D. B.; CASTRO, F. F. M. Indicações de imunoterapia alérgenospecífica. In: CASTRO, F. F.M; GALVÃO, C. E. **Imunoterapia**. Barueri: Manole, 2011. 221p.