

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2018.

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

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

Murilo Luiz Bazon

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

RIO CLARO

São Paulo - Brasil

MURILO LUIZ BAZON

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Brochetto Braga

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

Rio Claro - SP

2017

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

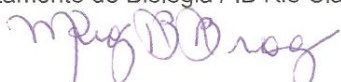
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Expressão heteróloga, purificação e análise da imunoreatividade do alérgeno antígeno 5 do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae)

AUTOR: MURILO LUIZ BAZON

ORIENTADORA: MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA

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

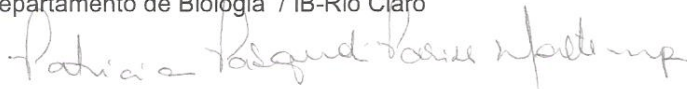
Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



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



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



Rio Claro, 23 de fevereiro de 2017

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

A vespa social *Polybia paulista* é muito agressiva e abundante nos Estados de São Paulo e Sul de Minas Gerais e, responsável por muitos acidentes de importância médica. Os principais alérgenos (Fosfolipase, Hialuronidase e Antígeno 5) de seu veneno já foram caracterizados por estudos proteômicos porém, os estudos em nível molecular estão em andamento pelo nosso grupo. O Antígeno 5 (Ag 5) (~23 kDa) tem sido relatado, em alguns venenos de vespas, como um dos mais abundantes e importantes alérgenos, com elevada prevalência de ligação a IgE (em *Vespula vulgaris* e em *Polistes versicolor*) enquanto que em outros, como uma molécula hipoalergênica (em *Polybia scutellaris*). No Brasil, ainda não existem extratos alergênicos ou componentes padronizados para o tratamento e diagnóstico de alergia ao veneno de Hymenoptera. Neste trabalho, o Ag 5 de *P. paulista* foi clonado, sequenciado, expresso utilizando a levedura *Pichia pastoris* X-33, purificado e analisado mediante a imunodeteção por IgE. Os maiores níveis de expressão da proteína recombinante *rPoly p 5* foram obtidos em meio BMMY, a 28°C após 120 horas de indução com metanol. O alérgeno recombinante (*rPoly p 5*), obtido no meio extracelular, foi purificado por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ e posteriormente por exclusão molecular em coluna de Sephadex-G 100 acoplada a um sistema AKTA-FPLC, com um rendimento de 158 µg/mL. Em paralelo, o Ag 5 nativo (*nPoly p 5*) foi extraído de glândulas de veneno de *P. paulista* e purificado através de cromatografia de troca catiônica. Análise de *Western Blotting* foi realizada para avaliar a reatividade IgE dos soros de 10 pacientes alérgicos ao veneno de *P. paulista* para *rPoly p 5* e *nPoly p 5*. Os resultados obtidos mostraram que *P. pastoris* é um sistema muito viável para a produção heteróloga do alérgeno *rPoly p 5* e que ambas as formas desse alérgeno foram capazes de se ligar à IgE de todos os soros de pacientes alérgicos testados. Portanto, os dados aqui encontrados podem ser utilizados para melhoria no diagnóstico e imunoterapia específica de alergia ao veneno de *Polybia paulista*.

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ordem Hymenoptera

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

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

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

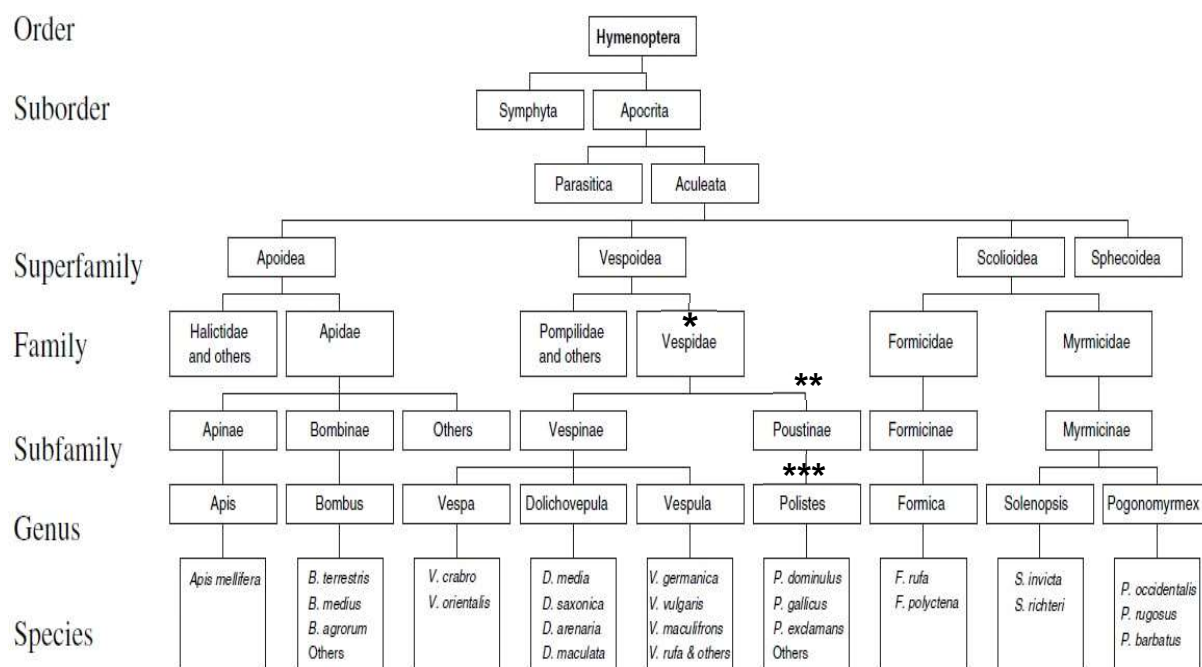
Figura 1. *Polybia paulista*



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

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

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



Fonte: (BILÒ, 2005).

1.2 Venenos de Vespas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 ANTÍGENO 5

2.1 Primeiros relatos e características gerais

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

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

7 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIA

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

CASCONE, O.; AMARAL, V.; FERRARA, P.; VITA, N.; GUILLEMOT, J. C.; DÍAZ, L.E. Purification and characterization of two forms of antigen-5 from the *Polybia scutellaris* venom. **Toxicon**, Elmsford, v.38, p. 1367-1379, 1995

CASTRO F.F.M ; PALMA, M.S. **Alergia a Venenos de Insetos**. 1. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, v. 1. 236 p, 2008.

CASTRO, F.F.M.; PALMA, M.S. **Alergia a venenos de insetos**. Phadia, Brasil, p. 231, 2009.

CASTRO, F.F.M.; PALMA, M.S.; BROCHETTO-BRAGA, M.R.; MALASPINA, O.; LAZARETI, J.; BALDO, M.A.B.; ANTILA, M.A.; ZUPI, L.; CONSERMELLI, W. Biochemical properties and study of cross-antigenicity between Africanized honey bee and wasp venom. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, New York, v.4, p.37- 41, 1994.

CEREGHINO, J. L., CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Review**, 24(1):45-66, 2000.

CEREGHINO, J.L., GEOFF P, ILGEN C, CREGG JM. Production of recombinant proteins in ferment or cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotechnol**, 13:329–332, 2002.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J.M. Toward na understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc Natl Acad Sci.**, USA, 96, p. 15155-15160, 1999.

CHAUD-NETO, J; GOBBI. ; MALASPINA, O. **Biologia e técnica de manejo de abelhas e vespas**. In: BARRAVIERA B. (Ed.). Venenos animais: Uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC. Cap.12, p. 173-193, 1994.

COS, O.; RESINA, D.; FERRER, P.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. **Biochemical Enginnering Journal**, 26: 86-94, 2005.

COSTA, H.; PALMA, M.S. Agelotoxin: a phospholipase A2 from the venom of the neotropical social wasp cassununga (*Agelaia pallipes pallipes*) (Hymenoptera- Vespidae). **Toxicon**, Elmsford, v.38, p.1367-1379, 2000.

COUDERC R, BARATTI J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agric Biol Chem**, 44: 2279-2289, 1980.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, p. 1316-1323, 1989.

CREGG, J. M.; MADDEN, K.R. Development of methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production foreign proteins. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 29, p. 33-41, 1988.

CREGG, J. M.; TSCHOPP, J. F.; STILLMAN, C.; SIEGEL, R.; AKONG, M.; CRAIG, W. S.; BUCKHOLZ, R.G.; MADDEN, L. R.; KELLARIS, P. A.; DAVIS, G. R.; SMILEY, B. L.; CRUZE, J.; TORREGROSSA, R.; VELICELEBI, G.; THILL, G. P. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 5, p. 479-485, 1987.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* (Review). **Bio/Technology**, 11:905-910, 1993.

DAMASCENO LM, HUANG CJ, BATT CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, 93(1):31-9, 2012.

DE SCHUTTER K, LIN YC, TIELS P, VAN HECKE A, GLINKA S, WEBER-LEHMANN J, ROUZE P, VAN DE PEER Y, CALLEWAERT N: Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nat Biotechnol**, 27:561-566, 2009.

DEMAIN AL, VAISHNAV P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv.**, 27(3):297-306, 2009.

EBERLEIN, B., KRISCHAN, L., DARSOW, U., OLLERT, M., RING, J. Double positivity to bee and wasp venom: Improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. **J.Allergy Clin. Immunol.** v.130, p.155-161, 2012.

ERZEN, R.; KOROSK, P.; SILAR, M.; MUSIC, E.; KOSNIK, M. Carbohydrate epitopes as a cause of cross-reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom. **The Middle European Journal of Medicine**, v. 121, p. 349-352, 2009.

ESHER, S.H.G.; CASTRO, A.P.B.M.; CROCE, J.; PALMA, M.S.; MALASPINA, O.; PALMA, M.F.M.; KALLI, J.E.; CASTRO, F.F.M. Study of laboratorial methods for Hymenoptera allergy diagnosis: A critical analysis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.107, n.2, p.375, 2001.

FABER, K. N., HARDER, W., AB, G., VEENHUIS, M. Review: Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. **Yeast**, 11:1331-1344, 1995.

FARRELL, A. M.; TAYLOR, D.; HOLLAND, K. T. "Cloning, Nucleotide Sequence Determination and Expression of the *Staphylococcus aureus* Hyaluronate Lyase Gene". **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 81-85, 1995.

FERRY, X.; EICHWALD, V.; DAEFFLER, L.; LANDRY, Y. Activation of $\beta\gamma$ subunits of Gi2 and Gi3 proteins by basic secretagogues induces exocytosis through phospholipases C β and arachidonate release through phospholipases C γ in mast cells. **J. Immunol.**, v.167, p.4805-4813, 2001.

FITZGERALD, K.T.; FLOOD, A.A. **Hymenoptera stings**. Clin. Tech. Small Anim. Pract, p.194–204, 2006.

GIBBS, G. M.; ROELANTS, K.; O'BRYAN, M. K. The CAP Superfamily: Cysteine- Rich Secretory Proteins, Antigen-5 and Pathogenesis-Related 1 Proteins – Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense. **Endocrine Reviews**, 29(7), p. 865-897, 2008.

GIRATTO, D.T., SUEMASU, C.N., JACOMINI, D.L.J.; BROCHETTO-BRAGA, M.R. *Polybia paulista* clone 2.4 venom allergen 5 mRNA, partial cds. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU573767.1>, 2010.

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

HABERMANN, E.; NEUMAN, W.P. Reinigung der phospholipase A des Bienengiftes. **Biochem.**, Moscow, v.28, p.465-473, 1957.

HAN, J.; YOU, D.; XU, X.; HAN, W.; LU, Y.; LAI, R.; MENG, Q. An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. **Toxicon**. 914-22, 2008.

HANSON, P.E. & GAULD, I.D. (Eds.). The Hymenoptera of Costa Rica. **Oxford: Oxford University Press**, 893 pp, 1995.

HENRIKSEN, A.; KING, T. P.; MIRZA, O. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: Structural characterization of a Pathogenesis-related protein superfamily. **Proteins: Structure and Genetics**, 45, 438-448, 2001.

HINNEN A, BUXTON F, CHAUDHURI B, HEIM J, HOTTIGER T, MEYHACK B, POHLIG G.. In: Smith, A. Gene Expression in Recombinant Microorganisms. **Marcel Dekker**, New York, pp. 121-193. 1994.

HOFFMAN, D.R. Allergens in Hymenoptera Venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic crossreactivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.91, p.71-78, 1993.

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

HOLLOWKA, D.; BAIRD, B. Antigen-mediated IgE receptor aggregation and signaling: A window on cell surface structure and dynamics. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25, p. 79-112, 1996.

JIN, C., HANTUSCH, B., HEMMER, W., STADLMANN, J., ALTMANN F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins.. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.121, p.185-190, 2008

JUNG E, WILLIAMS KL. The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 25, 3-8, 1997.

JUSTO JACOMINI, D.L., CAMPOS PEREIRA, F. D., PINTO, J. R. A.S., DELAZARI, L. S., SILVA NETO, A. J., GIRATTO, D. T., PALMA, M. S., ZOLLNER, R. L., BROCHETTO BRAGA, M. R. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v. 64, p.70–80, 2013.

JUSTO JACOMINI, D.L., MOREIRA, S. M. G., CAMPOS PEREIRA, F. D., ZOLLNER, R. L., BROCHETTO BRAGA, M. R. Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom. **Toxicon**, v 82 , p. 104–111, 2014.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen specific immunotherapy T-cell tolerance and more. **Allergy**. v. 61, p. 796-807, 2006.

KARABUS, S. Hipersensitivity to stinging insects. **Current Allergy & Clinical Immunology**, v.25, n.3, p.132-138, 2012.

KINET, J.P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. **Annu. Rev. Immunol.**, v.17, p.931-972, 1999.

KING, T. P. Cloning and sequencing vespoid venom allergens: Sequence similarity and antigenic cross reactivity of hornet antigen 5 and tobacco leaf protein. In **Allergy and Molecular Biology**. Ed. Pergamon Press, New York, v.74, p.129-136, 1989.

KING, T. P. Immunochemical studies of stinging insect venom allergens. **Toxicon**, 34(11/12):1455-1458, 1996.

KING, T. P.; ALAGON, A.C.; KUAN, J.; SOBOTKA, A.K.; LICHTENSTEIN, L. M. Immunochemical studies of yellow jacket venom proteins. **Mol Immunol**, v. 20, p. 297–308, 1983.

KING, T.P.; MORAN, D.; WANG, D.F.; KOCHOUMIAN, L. CHAIT, B.T. Structural studies of a hornet venom allergen antigen 5, *DoI m V* and its sequence similarity with other proteins. **Protein Seq. Data. Anal.**, New York, v.3, n.3, p.263-266, 1990.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PRZYBILLA, B.; RUËFF, F. Hymenoptera venom allergy. **Journal of the German**, Munich, German, v. 8, p. 114-129, 2010.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol.**, 48, p. 73-88, 2003.

RICHES, H. R. C. Hypersensitivity to bee venom. **Bee World**, Bucks, v.63, p.7-22, 1982.

ROGGENKAMP, R.; JANWIEZ, Z.; STANIKOWSKI, B; HOLLENBERG, C. P. Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Molecular & general genetics**, v. 194, p. 489-493, 1984. Quoted in LIN CEREGHINO, L; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**, 6:527-533, 1995.

SANTOS, L. D. **Caracterização Molecular dos Antígenos Imunodominantes do Veneno da Vespa Social *Polybia paulista***. Tese (Doutorado em CiênciasBiológicas, Área de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.181, 2006.

SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; PINTO, J. R. A. S.; DIAS, N. B.; SOUZA, B. M.; SANTOS, M. F.; PERALES, J.; DOMONT, G. B.; CASTRO, F. M.; KALIL, E. J.; PALMA, M. S. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: A clue to understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research**, v.9, p.3867-3877, 2010.

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

SANTOS-PINTO, J. R. A. Caracterização do antígeno-5, alérgeno do veneno da vespa social *Polybia paulista* com uma abordagem proteômica. Dissertação (Mestrado em CiênciasBiológicas, Área de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.108, 2011.

SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; ARCURI, H. A.; CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Using Proteomic Strategies for Sequencing and Post-Translational Modifications Assignment of Antigen-5, a Major Allergen from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. **Journal of Proteome Research**, v.13, n. 2, p. 855–865, 2014a.

SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; ARCURI, H. A.; MENEGASSO, A.R.S., PÊGO, P. N., SANTOS, K.S., CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; DE-SIMONE, S.G., PALMA, M. S. B-cell linear epitopes mapping of antigen-5 allergen from *Polybia paulista* wasp venom. **J. Allergy and Clinical Immunol.** Disponível *online* (in press), 2014b.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989.

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

SEISMANN, H., BLANK, S., BRAREN, I., GREUNKE, K., CIFUENTES, L., GRUNWALD, T., BREDEHORST, R., OLLERT, M., SPILLNER, E. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. **Mol Immunol.** v47, p.799–808, 2010.

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

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

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

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

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

VAN VAERENBERGH, M.; CARDOEN, D.; FORMESYN, E.M.; BRUNAIN, M.; VAN DRIESSE, G.; BLANK, S.; SPILLNER, E.; WENSELEERS, T.; VERLEYEN, P.; SCHOOF, L.; DEVREESE, B.; GRAAF, D.C. Extending the honey bee venom with the antimicrobial peptide apidaecin and a protein resembling wasp antigen 5. **Insect Molecular Biology**, 199-210, 2013.

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

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

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

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