RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 05/08/2023.

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

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

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

ISABELA OLIVEIRA SANDRINI ASSUGENI

Rio Claro – SP
2021

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

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

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

ISABELA OLIVEIRA SANDRINI ASSUGENI

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

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

Rio Claro – SP
2021

A851e

Assugeni, Isabela Oliveira Sandrini

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

73 p. : il., fotos

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

Orientadora: Márcia Regina Brochetto-Braga

Coorientadora: Luis Gustavo Romani Fernandes

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

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

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

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

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

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

Rio Claro, 05 de agosto de 2021

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

Por serem a minha força.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito obrigada a todos!

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

- legado

Rupi Kaur

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD – 7-amino-actinomicina-D

Ag5 – Antígeno 5

BMGY – Buffered methanol-complex medium

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

BMMY – Buffered glycerol-complex medium

BV-2 – Linhagem celular murina de células da micróglia

CAP – Superfamília de proteínas

CRD – Diagnóstico por componente resolvido

CCDs – Carboidratos determinantes de reatividade cruzada

CD – Grupo de diferenciação

CRISP – Proteínas secretoras ricas em resíduos de cisteínas

DII - Doença inflamatória intestinal

DMEM – Dulbecco's modified eagle's medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

EBI3 – Epstein-Barr-virus-induced gene 3

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

F4/80 – Marcador de superfície de macrófagos murinos

FCSB – Tampão de marcação para citometria

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

Hyal – Hialuronidase

IFN – Intérferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

iNOS – Isoforma indusível da sintase de óxido nítrico

IκB – Complexo de quinases Iκ

L929 - Linhagem celular murina de fibroblastos

LPS – Lipopolissacarídeo

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos

M1 – Macrófagos classicamente ativados

M2 – Macrófagos alternativamente ativados

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

MFI – Média da incidência de fluorescência

MHC-II – Complexo de histocompatibilidade principal de classe II

NF-κB – Fator nuclear de ativação kappa B

NO – Óxido nítrico/nitrito

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

PBS – Tampão salina-fosfato

PES – Polietersulfona

PLA1 – Fosfolipase A 1

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

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

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

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

PPRs – Receptores de reconhecimento de padrões

PS – Fosfatidilserina

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

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

SFB – Soro fetal bovino

SPF – Condições livres de patógenos comuns

TGF – Fator transformador de crescimento

Th2 – Linfócitos T helper tipo 2

TNF – Fator de necrose tumoral

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

VIT – Imunoterapia com alérgeno específico de veneno

YNB – Yeast nitrogen base medium

YPD – Yeast extract peptone dextrose

SUMÁRIO

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

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

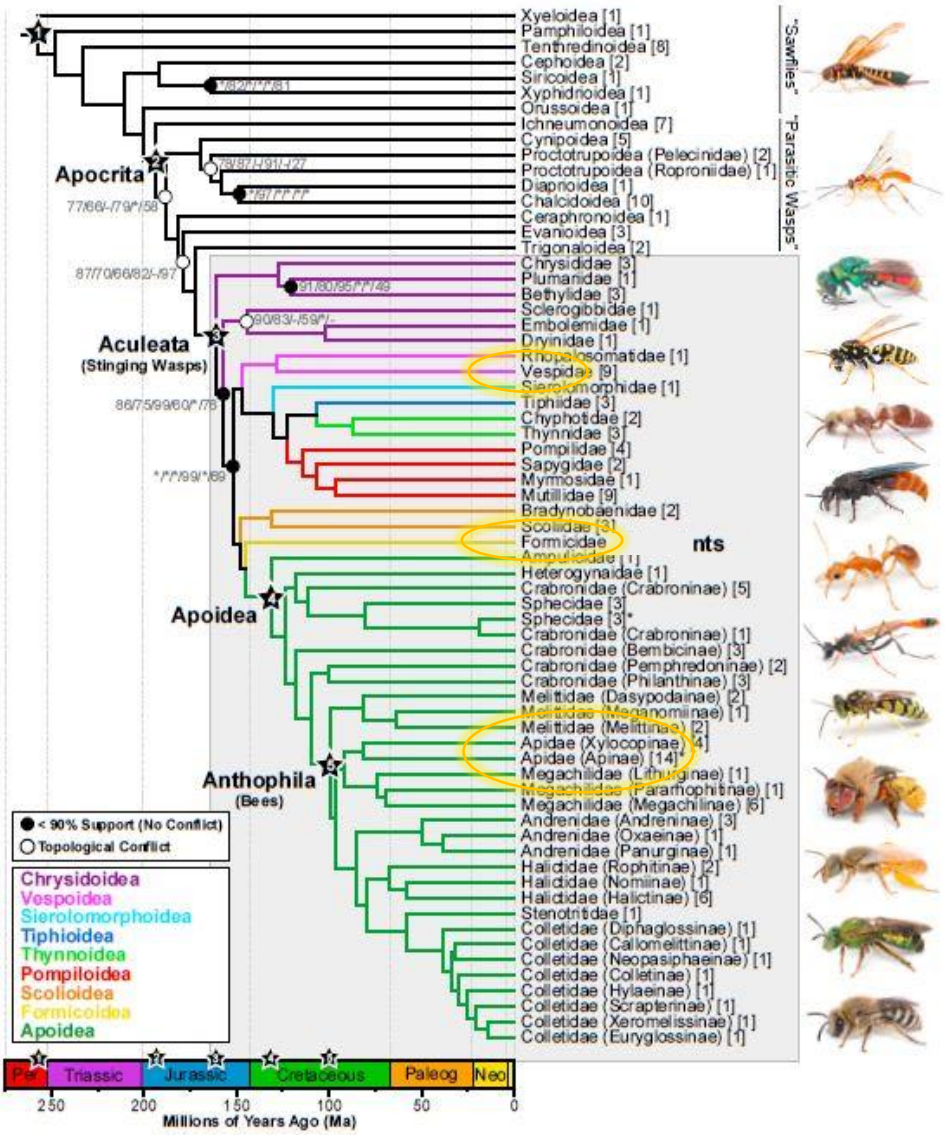
1. Introdução

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

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

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

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



Fonte: BRANSTETTER et al., 2017

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

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

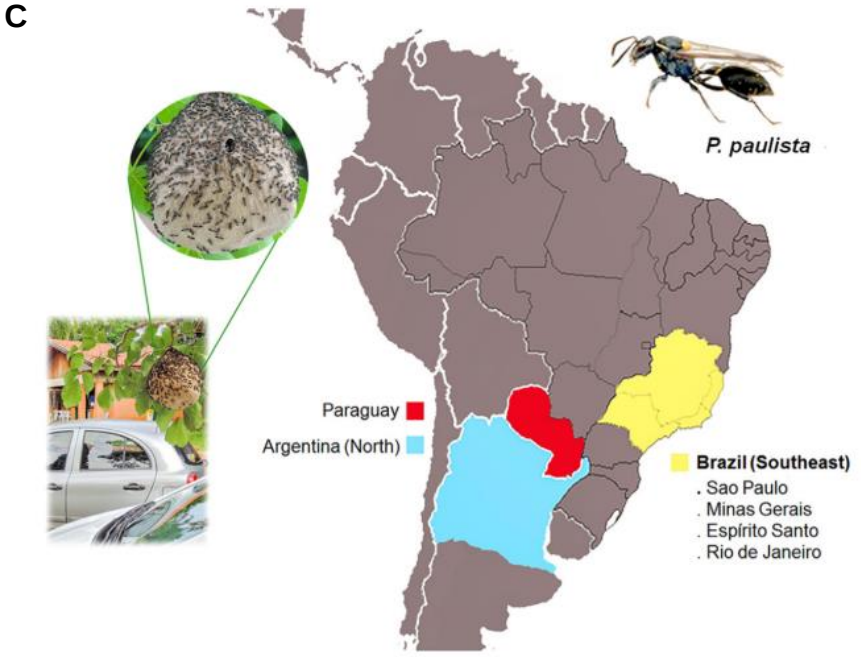
Figura 2 – **A vespa social *Polybia paulista*. A** Ilustração de um inseto da espécie *Polybia paulista*. **B** Representação de um ninho de insetos desta espécie. **C** Distribuição da vespa social *P. paulista* na América do Sul.

A

Fonte: Prof. Dr. Mario Palma/ UNESP

B

C



Fonte: PEREZ-RIVEROL et al., 2017

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

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

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

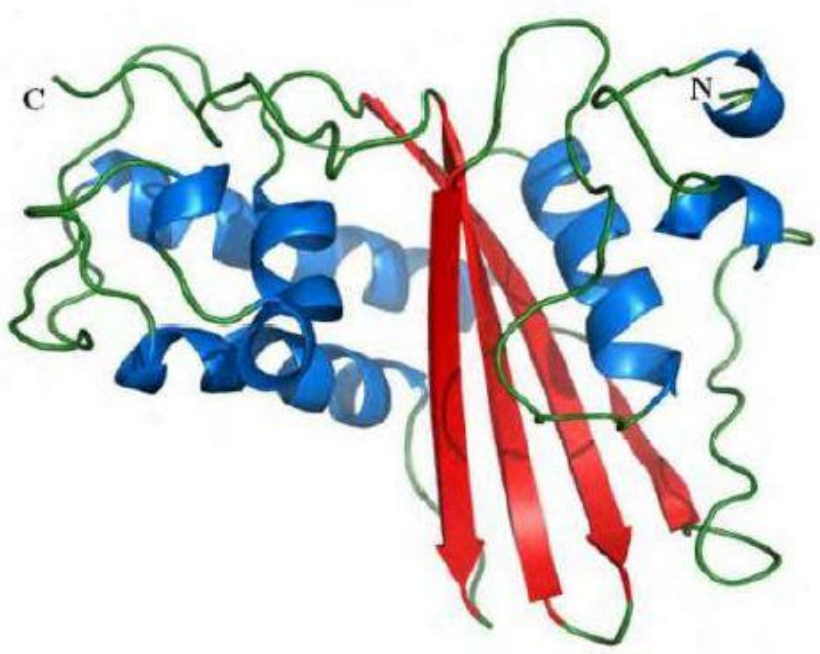
Dentre os três principais alérgenos supracitados, presentes no veneno de *P. paulista*, a Hyal (Poly p 2) e a PLA1 (Poly p 1) já foram caracterizadas e tiveram suas funções determinadas (PEREZ-RIVEROL et al., 2017, JUSTO JACOMINI et al., 2014). O Ag5 (Poly p 5), por sua vez, apesar de ainda não possuir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

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

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

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

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



Fonte: DOS SANTOS-PINTO et al., 2014

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

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

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

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

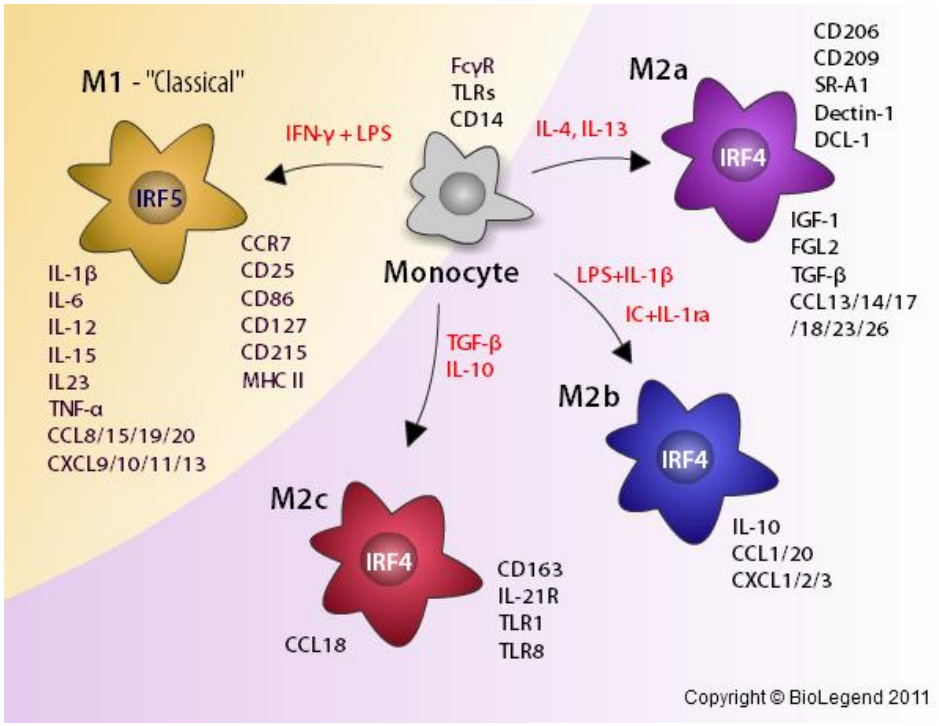
Em geral, os venenos de vespas levam à reação de hipersensibilidade tipo I, cuja resposta é dependente de IgE. A hipersensibilidade do tipo I é uma resposta imediata, caracterizada por uma reação antígeno-anticorpo, tendo como consequência alterações teciduais e vasculares (DE GRAAF et al., 2009, DEMAIN,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

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

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

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

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



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

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

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

Passar por uma reação anafilática pode ser um processo muito traumático, e, em muitos casos, a qualidade de vida após esse evento é prejudicada (BILÓ et al., 2005). Trzcinska et al. (2013) afirmam que a anafilaxia é uma reação que requer pronto diagnóstico e tratamento de emergência, porém um dos principais obstáculos para se obter um tratamento eficaz para as respostas de hipersensibilidade está na ocorrência de reações inespecíficas ou não definidas, ou seja, quando o paciente apresenta uma reação alérgica cruzada entre diferentes alérgenos de venenos de vespas, de vespa e abelha, ou ainda de vespa e formiga.

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

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

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

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

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

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

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

7. Considerações finais

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

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

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

8. Referências

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

ABREU, M. R. “Avaliação morfofisiológica e imunológica *in vitro* dos efeitos dos extratos salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae).” **Dissertação de Mestrado**, 153p. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2017.

AGUIAR, A. P., DEANS, A. R., ENGEL, M. S., et al. "Order hymenoptera", **Zootaxa**, v. 3703, n. 1, p. 51–62, 2013. DOI: 10.11646/zootaxa.3703.1.12.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BLANK, S., BAZON, M. L., GROSCH, J., et al. "Antigen 5 Allergens of Hymenoptera Venoms and Their Role in Diagnosis and Therapy of Venom Allergy", **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 20, n. 10, 2020. DOI: 10.1007/s11882-020-00954-0.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DOS SANTOS-PINTO, J. R. A., DOS SANTOS, L. D., ANDRADE ARCURI, H., et al. "Using proteomic strategies for sequencing and post-translational modifications assignment of antigen-5, a major allergen from the venom of the social wasp *Polybia paulista*", **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 2, p. 855–865, 2014. DOI: 10.1021/pr4008927.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JUSTO JACOMINI, D. L., CAMPOS PEREIRA, F. D., APARECIDO DOS SANTOS PINTO, J. R., et al. "Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis", **Toxicon**, v. 64, p. 70–80, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.12.019.

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

KAUSHIK, D. K., THOUNAOJAM, M. C., MITRA, A., et al. "*Vespa tropica* venom suppresses lipopolysaccharide-mediated secretion of pro-inflammatory cyto-chemokines by abrogating nuclear factor-κ B activation in microglia", **Inflammation Research**, v. 63, n. 8, p. 657–665, 2014. DOI: 10.1007/s00011-014-0738-0.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SIMIONI, P. U., FERNANDES, L. G. R., TAMASHIRO, W. M. S. C. "Downregulation of L-arginine metabolism in dendritic cells induces tolerance to exogenous antigen", **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 44–57, 2017. DOI: 10.1177/0394632016678873. .

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

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

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

TAVANO, R., SEGAT, D., GOBBO, M., et al. "The honeybee antimicrobial peptide apidaecin differentially immunomodulates human macrophages, monocytes and dendritic cells", **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 6, p. 614–622, 2011. DOI: 10.1159/000327839.

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

VINZÓN, S. E., PIRPIGNANI, M. L., NOWICKI, C., et al. "Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a hypoallergenic antigen 5", **Protein Expression and Purification**, v. 73, n. 1, p. 23–30, 2010. DOI: 10.1016/j.pep.2010.03.029.

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

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

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