KARINE DE AMICIS LIMA

**Identificação, expressão, purificação e caracterização de novos
alérgenos do veneno da vespa *Polybia paulista***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Fernandes Morato Castro

São Paulo

2017

KARINE DE AMICIS LIMA

**Identificação, expressão, purificação e caracterização de novos
alérgenos do veneno da vespa *Polybia paulista***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Fernandes Morato Castro

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Karine De Amicis

Identificação, expressão, purificação e caracterização de novos alérgenos do veneno da vespa *Polybia paulista* / Karine De Amicis Lima -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Keity Souza Santos.

Coorientador: Fabio Fernandes Morato Castro

Descritores: 1.Alérgenos 2.Hipersensibilidade 3.Himenópteros
4.Venenos 5.Vespas 6.Anafilaxia

Dedico esta tese a minha família, ao meu esposo e aos meus amigos, com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho. As minhas queridas avós, Meris e Lourdes (em memória), pelo infinito apoio e amor.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. À minha orientadora Dra. Keity Souza Santos por me acolher como sua primeira aluna e por contribuir muito para a minha formação. À todas colegas do grupo da Dra. Keity pela dedicação e amizade. Ao meu coorientador Prof. Dr. Fabio Fernandes Morato Castro por todo apoio e contribuição científica e à Dra. Alexandra Sayuri Watanabe e Dr. Clóvis Galvão pelo acompanhamento clínico dos pacientes deste estudo. Ao Prof. Dr. Mario Palma pela contribuição científica e acolhimento em seu laboratório. À todos os pós-graduandos, pós-doutorandos, pesquisadores, residentes e colegas do laboratório pelas discussões e esclarecimento das minhas dúvidas, pela contribuição científica e pela amizade. Ao Prof. Dr. Jorge Kalil por me acolher como aluna do seu departamento e por cada hora dedicada ao meu crescimento profissional. À diretoria do LIM 60 da FMUSP, do laboratório de imunologia do Instituto do Coração e ao Programa de pós-graduação em alergia e imunopatologia pelo espaço e apoio. À Prof. Dra. Fatima Ferreira-Briza, Dra. Gabrielle Gadermaier e a todos do grupo por todos os ensinamentos científicos e pelo acolhimento em Salzburg. Agradeço aos pacientes pela participação fundamental contribuindo para o avanço da ciência e para o meu desenvolvimento. Ao CNPQ, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro. À Deus pela vida, pela profissão que tanto amo e por me permitir realizar este longo trabalho. Aos meus pais, Flavio e Jaqueline, pelo apoio incansável e aos meus irmãos, Camila e Rodrigo, por acreditarem nos meus sonhos. Às minhas queridas avós pelo amor dedicado nas horas mais difíceis. Ao meu esposo Heles Junior pelo amor e paciência e à sua família por todo apoio e compreensão ao longo desta caminhada. Aos meus amigos pelo incentivo e pela amizade. À todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Normalização adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	20
LISTA DE TABELAS	22
RESUMO.....	23
SUMMARY	24
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	35
2.1 <i>Objetivos específicos</i>	<i>35</i>
3. MÉTODOS	36
3.1 <i>Aprovação ética</i>	<i>36</i>
3.2 <i>Perfil de pacientes e controles</i>	<i>36</i>
3.3 <i>Extração de veneno da vespa Polybia paulista</i>	<i>37</i>
3.4 <i>Deteção de IgE específica aos alérgenos dos venenos</i>	<i>38</i>
3.5 <i>Espectrometria de massas highthroughput do veneno de Polybia paulista ..</i>	<i>39</i>
3.6 <i>Similaridade entre as sequencias dos alérgenos recombinantes produzidos e alérgenos já descritos este item esta deslocado, tem q vir depois da producao do recombinante</i>	<i>39</i>
3.7 <i>Desenho do gene codificador para o antígeno 5 de Polybia paulista</i>	<i>40</i>
3.8 <i>Características físico-químicas do alérgeno recombinante</i>	<i>41</i>
3.9 <i>Modelagem molecular.....</i>	<i>41</i>
3.10 <i>Produção dos alérgenos recombinantes</i>	<i>41</i>
3.11 <i>Caracterização físico-química do rPoly p 5</i>	<i>42</i>
3.12 <i>Avaliação da reatividade a IgE.....</i>	<i>44</i>
3.13 <i>Avaliação da reatividade cruzada do antígeno 5 de Polybia paulista recombinante com alérgenos homólogos</i>	<i>44</i>
3.14 <i>Avaliação da capacidade de desgranulação do rPoly p 5.....</i>	<i>44</i>
3.15 <i>Registro no banco de sequências de proteínas.....</i>	<i>45</i>
3.16 <i>Reconhecimento do alérgeno pela IUIS.....</i>	<i>46</i>
4. RESULTADOS.....	47
4.1 <i>Dados demográficos e clínicos dos indivíduos do estudo</i>	<i>47</i>
4.2 <i>Avaliação clínica e diagnóstica para análise de sensibilização inseto específica.....</i>	<i>47</i>
4.3 <i>ELISA</i>	<i>49</i>

4.1	Western blotting 1D e identificação de novos alérgenos	51
4.2	Western blotting 1D	52
4.3	Abordagem highthroughput de espectrometria de massas do veneno total de <i>Polybia paulista</i>	53
4.4	Modelagem molecular.....	55
4.5	Produção do rPoly p 5	55
4.6	Caracterização físico-química do rPoly p 5.....	58
4.7	Avaliação da reatividade a IgE.....	60
4.8	Avaliação da reatividade cruzada do antígeno 5 de <i>Polybia paulista</i> recombinante com alérgenos homólogos	60
4.9	Teste de desgranulação de basófilos em linhagem celular	62
4.10	Registro no banco de sequencias de proteínas.....	63
4.11	Registro na base de dados de alérgenos da IUIS	63
5.	DISCUSSÃO	64
6.	CONCLUSÃO	69
7.	REFERÊNCIAS	70

Lista de figuras

Figura 1 - Mecanismos imunológicos envolvidos na fase de sensibilização nas reações alérgicas	3
Figura 2 - Mecanismos imunológicos envolvidos na fase efetora e tardia da reação alérgica	4
Figura 3 - <i>Polybia paulista</i>	17
Figura 4 - Esquema de abordagem atual utilizado para diagnóstico e tratamento de pacientes com suspeita de alergia a vespa baseado na história clínica, testes e extratos disponíveis. As condutas que geram dúvidas encontram-se em tracejado.....	34
Figura 5 - Processo de extração de glândulas de veneno da vespa <i>Polybia paulista</i> .	37
Figura 6 - Reatividade de IgE aos extratos de venenos de <i>Polybia paulista</i> e <i>Polistes</i> spp.	50
Figura 7 - Reatividade de IgE de cada paciente aos extratos de venenos de <i>Polybia paulista</i> e <i>Polistes</i> spp.....	51
Figura 8 - <i>Western blotting</i> 1D. MW: Marcador de peso molecular; Pb: veneno de <i>Polybia paulista</i> ; Pt: veneno de <i>Polistes</i> spp.....	52
Figura 9- <i>Western blotting</i> 1D.	52
Figura 11. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos do rPoly p 5 e Ves v5. .	55
Figura 12. Expressão do alérgeno rPoly p 5 verificada por SDS-PAGE.	56
Figura 13. Pureza das frações após a primeira fase de purificação.	56
Figura 14. Avaliação da pureza do rPoly p 5 após etapa final de purificação.	57
Figura 15. Análise da estabilidade do alérgeno rPoly p 5.....	57
Figura 17. Comparação entre a composição de aminoácidos analisada teórica (vermelho) e experimentalmente (verde).	58
Figura 18. Composição da estrutura secundária do rPoly p 5	59
Figura 19. População de moléculas monoméricas	60

Figura 21. Reatividade cruzada de IgE com homólogos de Poly p 5 em outras espécies de vespas.	61
Figura 22. Reatividade cruzada de IgE com homólogos de Poly p 5 em outras espécies de vespas analisado por paciente.....	62
Figura 23. Capacidade alergênica do rPoly p 5.....	63

Lista de tabelas

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos da população do estudo47

Tabela 2 – Dados de sensibilização IgE específica aos venenos de vespas.....47

Resumo

Lima KA. Identificação, expressão, purificação e caracterização de novos alérgenos do veneno da vespa *Polybia paulista* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

As hipersensibilidades do tipo I são caracterizadas por um grupo heterogêneo de manifestações clínicas que atingem mais de 30% da população mundial. Novas reatividades a alérgenos regionais brasileiros têm sido descritas e muitas fontes ainda não são totalmente conhecidas. Dentre os alérgenos mais prevalentes estão os venenos de insetos. A vespa regional *Polybia paulista* (Hymenoptera vespidae) é endêmica no sudeste do Brasil e é responsável por acidentes graves, causando reações alérgicas que podem levar ao choque anafilático. Alguns componentes dos venenos de vespas de diferentes espécies apresentam mimetismo molecular ou biológico, podendo gerar reação imunológica cruzada, mas muitas vezes não são os responsáveis pelo desencadeamento da resposta alérgica. Isto ocasiona falha no diagnóstico e consequentemente no tratamento indicado, a imunoterapia alérgeno-específica. Diante desses fatos e do grande número de pacientes que procuram o Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas de São Paulo (HCFMUSP) com manifestações clínicas de alergias a ferroadas de insetos, foi desenvolvida uma sistemática de investigação clínica e laboratorial, com ênfase na abordagem proteômica, para identificar e caracterizar físico-química e imunologicamente novos alérgenos do veneno da vespa *Polybia paulista* e estudar potenciais reatividades cruzadas com alérgenos já conhecidos. Vinte e um pacientes com história de anafilaxia a venenos de vespa foram selecionados para participar do estudo. Foram realizados testes cutâneos e *in vitro* com veneno de *Polistes* spp. disponível comercialmente e com o veneno da *Polybia paulista*, produzido seguindo o protocolo padronizado anteriormente. Os resultados mostraram que a maioria dos pacientes apresentam IgE específica para os dois venenos com maior reatividade ao veneno de *Polybia* e que o padrão de proteínas reconhecidas entre os dois venenos é diferente, evidenciando a necessidade de veneno de *Polybia paulista* na prática clínica nas regiões cuja vespa está presente. Foram identificadas mais de 2000 proteínas no extrato total do veneno de *Polybia paulista* e algumas proteínas alergênicas ainda não descritas. Dentre elas foi identificada uma nova isoforma ao antígeno 5 da vespa *Polybia scutellaris* relatada como hipoalergênica. A molécula foi produzida na forma recombinante com conformação adequada, pela primeira vez em *E. coli*. O alérgeno, registrado na IUIS como Poly p 5, foi reconhecido por IgEs no soro dos pacientes testados e apresenta reatividade cruzada com outros antígenos 5 homólogos. Testes de desgranulação de basófilos em linhagem celular de ratos mostraram que o Poly p 5 induziu pouca desgranulação, indicando seu potencial hipoalergênico.

Descritores: alérgenos; hipersensibilidade; himenópteros; venenos; vespas; anafilaxia.

Summary

Lima KA. Identification, expression, purification and characterization of new allergens from the *Polybia paulista* wasp venom [Thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo"; 2017.

Type I hypersensitivity is characterized by heterogeneous clinical manifestations and specialists estimate that today around 30% of the general population suffers from an allergic disease. New allergens are being reported and some sources are not yet identified. Insect venoms are amongst the most prevalent allergen sources. The social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera vespidae) is endemic in the southeastern of Brazil and is responsible for serious accidents due to their venomous stings, causing allergic reactions that can lead to anaphylactic shock. Several components presenting molecular or biological mimicry can be found in different species of wasps and lead to a cross-immunological reaction but they are not always responsible for the allergic manifestations. Therefore, diagnostic and consequently immunotherapy is unsuccessful, since specific allergen identification is crucial. Considering the high number of patients attended at the "Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas de São Paulo" with clinical manifestations of allergies not yet determined or barely studied, an approach involving a systematic clinical, laboratorial and investigative practice through a proteomic analysis was created to identify and characterize new allergens of *Polybia paulista* venom. Twenty-one patients with clinical history of anaphylaxis to Hymenoptera venoms were selected for this work. Cutaneous and in vitro tests were performed using *Polistes* venom commercially available as well as *Polybia paulista* venom, produced following a published protocol. The results shows that the majority of the patients has specific IgE for both venoms with biggest reactivity to *Polybia paulista* venom and the protein profile recognized in these venoms is different. More than 2000 proteins were identified in the whole venom extract of *Polybia paulista* and some of the allergenic proteins are not yet described in this venom. Among them, a new isoform that is similar to antigen 5 from *Polybia scutellaris*, already known as hypoallergenic. The molecule was produced as a recombinant properly folded for the first time in *E. coli*. The allergen, registered at IUIS as Poly p 5, was recognized by IgEs in the sera of 50% of the patients tested and has cross-reactivity with other homologs of antigen 5. Basophil degranulation tests in rat lineage cells showed that Poly p 5 induced little degranulation, indicating the hypoallergenic potential of this molecule.

Descriptors: allergens; hypersensitivity; hymenoptera; poisons; wasps; anaphylaxis.

1. Introdução

O Sistema imunológico é uma rede interativa complexa composta por células e moléculas com a capacidade de proteger o hospedeiro de uma ampla gama de patógenos, enquanto mantém um estado de tolerância ao próprio e a antígenos externos inócuos. Tem a capacidade de reagir e distinguir entre um número enorme de diferentes proteínas, as quais formam a mais abundante e diversificada classe de antígenos.

A interação entre um anticorpo e seu antígeno ocorre de forma específica e com alta afinidade. Os anticorpos se ligam a seus antígenos correspondentes em locais específicos conhecidos como determinantes antigênicos ou epítomos (RUBINSTEIN et al., 2008). Epítomos são regiões do antígeno que possuem aspectos físicos e químicos que favorecem o reconhecimento pelas regiões específicas dos anticorpos ou dos receptores de células-T. Portanto, são regiões do antígeno reconhecidas pelo sistema imune especificamente por meio de células-B e células-T (GOLDSBY et al., 2003).

Os epítomos de células-T são apresentados sobre a superfície de uma célula apresentadora de antígeno (APC), onde são ligados às moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade). São tipicamente peptídeos constituídos por 8 a 11 resíduos de aminoácidos que se ligam às proteínas de MHC, glicoproteínas integrais de membrana, sendo apresentados como epítomos de células-T aos receptores de células-T. Já os epítomos de células-B são reconhecidos diretamente por anticorpos inseridos nas membranas de células-B que podem reconhecer uma enorme variedade de antígenos. Não necessitam de células apresentadoras de antígeno, possuem de 4 a 15 resíduos de aminoácidos e estão localizados na superfície da proteína (ABBAS et al., 2008).

Um antígeno pode ser reconhecido por várias células-B que se ligam a partes diferentes do antígeno. Desta forma, um antígeno grande como uma proteína, pode possuir vários epítomos, cada qual induzindo a produção de um anticorpo específico. Os antígenos são muito diversos, variando em tamanho, bem como na composição de sua sequência primária. No caso das proteínas, modificações pós traducionais como a adição de carboidratos durante a glicosilação, pode alterar a estrutura secundária (WESTWOOD et al., 2001).

Doenças relacionadas à imuno-tolerância como o câncer, autoimunidade e doenças alérgicas surgem como uma consequência direta de respostas imunológicas desreguladas (1–5).

A alergia é uma reação imunológica imediata, desencadeada através de hipersensibilidade a uma variedade de antígenos ambientais. O termo “hipersensibilidade” originou-se a partir da definição clínica de imunidade como “sensibilidade”, que se baseia na observação de que respostas imunológicas podem ser geradas inapropriadamente e exacerbadamente frente a um antígeno inócuo, em contatos subsequentes (Abbas, 2011, *Imunologia Celular e Molecular*).

Existem 4 tipos de hipersensibilidade, sendo a do tipo I, reações imediatas com o envolvimento de anticorpos, mastócitos e basófilos, direcionadas a antígenos ambientais. Estes antígenos ambientais, chamados de alérgenos, compartilham a habilidade de induzir respostas imunológicas adquiridas que são orquestradas por linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 2 (Th2) e incluem a produção de imunoglobulinas do tipo E (IgE) específicas aos alérgenos (Galli & Tsai, 2012; Paul & Zhu, 2010).

A alergia se desenvolve em duas fases, uma imediata (Figura 1) e uma tardia (Figura 2). A fase imediata da alergia é desencadeada a partir da primeira exposição do indivíduo sensível a um alérgeno. O alérgeno é capturado pelas células dendríticas residentes no epitélio que o transportam até os linfonodos para ser processado e apresentado para as células T CD4⁺ virgens. Estas células T CD4⁺ se diferenciam em células Th2 na presença das citocinas IL4 e IL13, que por sua vez estimulam a troca de classe das células B, para que se diferenciem em plasmócitos e secretem IgEs específicas ao alérgeno (Gauchat, 1993, *Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils*). As células Th2 também secretam IL5, uma interleucina que ativa potentemente os eosinófilos presentes no local da inflamação (Hurez, 1990, [The role of cytokines in allergic inflammation]).

As IgEs geradas frente a primeira exposição ao alérgeno, ligam-se aos receptores de alta afinidade a IgE (FcεRI) em mastócitos do tecido ou em basófilos circulantes no sangue, tornando-os sensibilizados (Kinet, 1999, *The high-affinity IgE receptor (FcεRI) : from physiology to pathology*).

Em um próximo contato com o alérgeno, os mastócitos e basófilos sensibilizados são ativados, cascatas de sinalização intracelulares são desencadeadas, culminando na liberação de mediadores inflamatórios que estavam armazenados nos grânulos citoplasmáticos destas células, como histamina, heparina, triptase, mediadores lipídicos e citocinas, responsáveis pelas reações biológicas locais e sistêmicas das hipersensibilidades imediatas (Rivera, 2006, *Molecular regulation of mast cell activation*; Rivera, 2008, *New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE*; Boyce, 2007, *Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation*).

Fonte: Immunological Reviews. Volume 278, Issue 1, pages 219-236, 28 JUN 2017
DOI: 10.1111/imr.12555.

Figura 1 - Mecanismos imunológicos envolvidos na fase de sensibilização nas reações alérgicas.

Na fase tardia, os mastócitos produzem mais citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular que agem no recrutamento de eosinófilos da corrente sanguínea para o tecido inflamado, tornando-os ativados. Eosinófilos ativados liberam citocinas e mediadores pró-inflamatórios, que mantém o tecido no qual a reação de hipersensibilidade está ocorrendo continuamente inflamado (Ben-Zimra, 2013, Eosinophil major basic protein activates human cord blood mast cells primed with fibroblast membranes by integrin-β1).

Fonte: Immunological Reviews. Volume 278, Issue 1, pages 219-236, 28 JUN 2017
DOI: 10.1111/imr.12555.

Figura 2 - Mecanismos imunológicos envolvidos na fase efetora e tardia da reação alérgica

As manifestações clínicas mais frequentes da alergia são extensas reações locais e reações sistêmicas de início rápido, como prurido, urticária, angioedema, náusea, vômito, diarreia, rinoconjuntivite, broncoespasmo, hipotensão, colapso cardiovascular e perda de consciência (Ebo, 2005, Hymenoptera venom allergy.). A combinação destes sintomas caracteriza a anafilaxia, uma doença alérgica grave (Mace, 1908, THE REACTION OF ANAPHYLAXIS).

As fontes alergênicas mais comuns são os ácaros, as proteínas de animais, os alimentos, os fungos, os pólenes, os venenos de insetos e os medicamentos (Ebo, 2005, Flow cytometric analysis of in vitro activated basophils, specific IgE and skin tests in the diagnosis of pollen-associated food allergy.). Estas fontes alergênicas contêm milhares de proteínas, dentre elas estão os alérgenos. Os alérgenos podem ser componentes específicos daquela fonte alergênica ou de reatividade cruzada, que são proteínas similares presentes em outras fontes alergênicas e passíveis de

reconhecimento cruzado pela mesma IgE (Becker, 1994, [Molecular characterization of allergens]).

Um indivíduo pode ser sensibilizado por componentes únicos desta mistura de alérgenos, portanto o perfil de sensibilização e o tipo de reação que cada indivíduo apresentará, dependerá das características dos alérgenos, da disponibilidade destes na fonte alergênica no momento da sensibilização e das características de seu sistema imunológico (Woodfolk, 2015, Allergens`, sources`, particles`, and molecules: Why do we make IgE responses?).

Anafilaxia é uma reação de hipersensibilidade aguda potencialmente fatal, que envolve a liberação de mediadores dos mastócitos, basófilos e recrutamento de células inflamatórias. Anafilaxia inclui sintomas e sinais, isolados ou combinados, que ocorrem em minutos ou em até poucas horas da exposição ao agente causal.

Pode ser de intensidade leve, moderada ou grave. Na maioria dos casos a anafilaxia é de intensidade leve, mas tem o potencial de evoluir para fatalidade. A evolução é usualmente rápida, atingindo pico em 5-30 minutos, raramente pode perdurar por vários dias.

O termo anafilaxia é empregado para descrever reação imunológica, especialmente mediada por IgE. O termo anafilaxia não alérgica é usado para reação clinicamente idêntica, porém sem mecanismo imunológico envolvido. Entretanto, o diagnóstico e manejo clínico não diferem.

A manifestação inicial de anafilaxia pode ser perda de consciência. Os sintomas e sinais de anafilaxia podem se limitar a um sistema orgânico ou envolver vários sistemas:

- Gastrointestinal: Dor abdominal, aumento do peristaltismo com urgência para evacuar ou liberação de esfíncter, náusea, vômito, diarreia;
- Oral: Prurido labial, língua e palato, edema de lábios e língua;
- Respiratório: Obstrução de vias aéreas superiores por angioedema de língua, orofaringe ou laringe; broncoespasmo, aperto no peito, tosse, sibilância; rinite, espirros, congestão nasal e rinorréia;
- Cutânea: Eritema difuso, rubor, urticária, prurido, angioedema;
- Cardiovascular: Astenia, hipotensão, arritmia, choque hipovolêmico, síncope, dor torácica;
- Ocular: Edema periorbital, eritema, eritema conjuntival, lacrimejamento;
- Genitourinário: Cólicas uterinas, urgência miccional ou incontinência urinária.

Sintomas iniciais de maior gravidade desenvolvem-se rapidamente, atingem pico entre 3-30 minutos. Pode ocasionalmente haver um período de acalmia de 1 – 8 horas antes do desenvolvimento de uma segunda reação (resposta bifásica).

Anafilaxia protraída pode ocorrer, com sintomas persistentes por vários dias. Óbito pode ocorrer em minutos, mas raramente é descrito após dias ou semanas da reação anafilática inicial.

Resposta anafilática tem sido observada após a administração de sangue total e de seus produtos, incluindo soro, plasma, derivados do soro e imunoglobulinas. Um dos mecanismos responsáveis por estas reações é a formação de reação antígeno-anticorpo na superfície das células sanguíneas vermelhas ou pela formação de imunocomplexos com ativação do sistema do complemento. Os subprodutos ativos gerados pela ativação do complemento (anafilatoxinas C3a, C4a e C5a) causam desgranulação de mastócitos e basófilos, liberação de mediadores e anafilaxia. Adicionalmente, produtos derivados da cascata do complemento podem diretamente induzir aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa.

Indivíduos com deficiência de IgA podem se sensibilizar à IgA proveniente de derivados de sangue. Pacientes com deficiência de IgA (1:500 da população geral) podem desenvolver reação anafilática ao receberem derivados de sangue, devido a presença de anticorpos anti-IgA (provavelmente IgE anti-IgA).

Reações citotóxicas também podem causar anafilaxia, via ativação do complemento. Anticorpos (IgG e IgM) contra células sanguíneas vermelhas, ativam o complemento, como ocorre em reação transfusional com sangue incompatível. Esta reação causa aglutinação e lise de células sanguíneas vermelhas e ativação de mastócitos, resultando em anafilaxia.

Mastócitos podem desgranular quando expostos a agentes químicos de baixo peso molecular. Meio de contraste iodado hiperosmolar pode causar desgranulação de mastócitos por ativação do complemento e sistema de coagulação. Estas reações também podem ocorrer, porém com menor frequência, com os novos meios de contraste.

Narcóticos são ativadores de mastócitos capazes de causar elevação dos níveis de histamina e anafilaxia não alérgica, comumente observada por anesthesiologistas.

A anafilaxia é frequente no mundo todo (até 50-103 casos por 100.000 pessoas por ano) e a distribuição difere com a faixa etária (até 3 vezes em doentes com idades 0-4 anos), causa (anafilaxia induzida por alimentos é mais frequente em jovens e anafilaxia induzida por medicamentos e himenópteras, em pacientes mais velhos) e área geográfica (mais prevalente em áreas com menos luz solar). Uma questão

controversa e ainda não resolvida é se a alta incidência de anafilaxia é um aumento real ou meramente o resultado de uma melhor identificação de casos de anafilaxia pelos médicos (Tejedor Alonso, 2015, Epidemiology of anaphylaxis).

A morte por anafilaxia é um evento raro e extraordinário (0,12 a 1,06 mortes por milhão de pessoas por ano) e mais provável de ocorrer em indivíduos mais velhos, no caso de anafilaxia induzida por medicamentos e himenópteras (Tejedor Alonso, 2015, Epidemiology of anaphylaxis).

Estudos provenientes da Austrália, França, Suíça e EUA estimam incidência de reação sistêmica à picada de Himenópteras na faixa de 0,4% a 4% da população.

Nos EUA, no mínimo 40 óbitos ocorrem por ano como consequência de picada de himenópteras.

Nos EUA cerca de 40 mortes por ano são atribuídas ao choque anafilático devido a ferroadas de insetos. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, o número de acidentes envolvendo insetos já havia ultrapassado 4.000/ano em 2011. Dados mais recentes de um estudo do Ministério da saúde realizado durante os anos de 2000 a 2013 (Ministério, 2013, Dados epidemiológicos) mostram que foram notificados 77.066 casos de acidentes causados por abelhas apenas, os quais levaram 249 pessoas a óbito. Destes, 34.154 ocorreram na região sudeste do Brasil e resultaram em 85 óbitos. Embora esses números incluam notificações de acidentes tóxicos e alérgicos, estima-se que a maior parte deles tenha sido alérgico.

Apesar da alergia a veneno de insetos ser uma das causas mais frequentes de reações anafiláticas em adultos (Worm, 2014, First European data from the network of severe allergic reactions (NORA;Worm, 2014, Triggers and treatment of anaphylaxis: an analysis of 4',000 cases from Germany', Austria and Switzerland;Harduar-Morano, 2011, A population-based epidemiologic study of emergency department visits for anaphylaxis in Florida;Tejedor Alonso, 2015, Epidemiology of anaphylaxis), o número real de fatalidades pode ser subestimado visto que um estudo mostrou a presença de IgE específica para venenos de insetos em 23% das amostras de soro *post mortem* colhidas de indivíduos que morreram ao ar livre, repentinamente e sem causa aparente (Schwartz, 1986, Studies in stinging insect hypersensitivity: postmortem demonstration of antivenom IgE antibody in possible sting-related sudden death).

No Brasil não existem dados publicados sobre a epidemiologia da anafilaxia a venenos de himenópteras, porém um estudo retrospectivo em andamento no ambulatório de alergia do HCFMUSP (Cordova et. al, em preparação) verificou que 19% dos casos de anafilaxia atendidos foram causados por himenópteras e que destes, 37% por vespas.

O diagnóstico diferencial de anafilaxia inclui:

- Dificuldade respiratória ou colapso circulatório, inclusive reação vasovagal;
- Globo hístico;
- Crise de asma aguda grave;
- Aspiração de corpo estranho;
- Embolia pulmonar;
- Epiglotite;
- Infarto do miocárdio;
- Síndrome carcinoide;
- Angioedema hereditário;
- Feocromocitoma;
- Hipoglicemia;
- Crise convulsiva;
- Dose excessiva de medicação;
- Urticária ao frio;
- Urticária colinérgica;
- Ingestão de sulfitos e de glutamato monossódico;

Obstrução das vias aéreas superiores, broncoespasmo, cólicas abdominais, prurido, urticária e angioedema estão ausentes na reação vasovagal. Palidez, síncope, sudorese e náusea podem ocorrer em ambas as condições. Perante reações durante procedimentos médicos é importante considerar a possibilidade de reação ao látex ou medicação usada para anestesia.

Fatores causadores de anafilaxia devem ser identificados quando possível e evitados. Pacientes devem ser instruídos sobre como minimizar a exposição. Antagonistas β -adrenérgicos, inclusive os usados para tratamento de glaucoma, podem exacerbar anafilaxia e devem ser evitados, quando possível.

Adrenalina é a droga de escolha para o tratamento da anafilaxia. Indivíduos de alto risco para anafilaxia devem ser instruídos a usar adrenalina em seringas para auto-injeção. Injeção IM é recomendável, pois resulta em pronta elevação da concentração plasmática e efeito fisiológico. Injeção SC resulta em lenta absorção de adrenalina. Pacientes devem ser alertados para os sinais clínicos de reação anafilática iminente e quanto à necessidade de portar seringa auto-injetora de adrenalina por todo o tempo, bem como usar adrenalina logo no início dos sintomas.

Seringas não utilizadas devem ser imediatamente substituídas quando atingirem o vencimento, uma vez que o conteúdo de adrenalina e a biodisponibilidade da droga

diminuem proporcionalmente ao número de meses após o prazo de validade. Pré-tratamento com glicocorticóides e antihistamínicos H1 e H2, é recomendado para prevenir ou reduzir a gravidade da reação, quando for necessário administrar o agente sabidamente causador de reação anafilática, como, por exemplo, meio de contraste radiológico.

A alergia a venenos de himenópteras tem origem não atópica. É uma doença alérgica clássica mediada por anticorpos do tipo IgE que se ligam a receptores na superfície de mastócitos e basófilos (Johansson, 2001, Asthma, atopy, and IgE: what is the link?).

Aproximadamente 9.2 a 28.7% da população de adultos é sensibilizada a veneno de himenópteras (Helbling, 2004, Incidence of anaphylaxis with circulatory symptoms: a study over a 3-year period comprising 940,000 inhabitants of the Swiss Canton Bern.).

A prevalência de sensibilização de humanos aos venenos de Hymenoptera sociais foi estimada entre 9.3% e 28.5% na população mundial, o que justifica o crescente interesse no conhecimento da estrutura e função dos componentes do veneno desses insetos.

Os acidentes envolvendo himenópteras são frequentes no mundo todo. Os envenenamentos em massa podem resultar em reações imediatas e tardias (Kolecki, 1999, Delayed toxic reaction following massive bee envenomation) podendo levar à morte (Tunget, 1993, Invasion of the 'killer' bees. Separating fact from fiction.; Franca, 1994, SEVERE AND FATAL MASS ATTACKS BY KILLER BEES (AFRICANIZED HONEY-BEES APIS-MELLIFERA-SCUTELLATA IN BRAZIL - CLINICOPATHOLOGICAL STUDIES WITH MEASUREMENT OF SERUM VENOM CONCENTRATIONS). Entretanto, a maioria das mortes ou acidentes com relevância clínica geralmente envolvem um número reduzido de ferroadas e são mais frequentemente associadas a respostas alérgicas do que a reações tóxicas. De 30 a 60% dos pacientes com história de anafilaxia a venenos de insetos apresentarão uma nova reação sistêmica igual ou mais intensa quando ferroados novamente. Mesmo dois ou três anos após a ferroadada por vespa, anticorpos IgE específicos ainda podem ser encontrados em 20 a 30% dos adultos, o que aumenta a probabilidade do desenvolvimento de uma reação anafilática após uma nova exposição ao veneno do inseto (Golden, 1989, Epidemiology of insect venom sensitivity.).

Os mecanismos das reações variam de hipersensibilidade imediata IgE mediada a reações tardias, mediada por anticorpos e imunocomplexos, citotóxicas, além de reações pseudo-alérgicas por desgranulação direta de mastócitos sem a participação

de anticorpos mediadores. Existem ainda reações tóxicas dependendo da quantidade de insetos e da quantidade do veneno inoculado, ou seja, mesmo no indivíduo não sensibilizado uma quantidade de veneno grande pode levar a reações fatais. Existem ainda reações em pacientes com doenças de base e agravamento das mesmas. Dentre as manifestações clínicas imediatas, encontramos dois subtipos: reações locais extensas e reações sistêmicas, encontrando-se anticorpos da classe IgG e IgE. É bom salientar que qualquer indivíduo, mesmo não alérgico, ao ser ferido por inseto himenóptero pode vir a apresentar algum edema no local, dor e ardor, dependendo da localização e característica da pele. O edema por si não caracteriza uma reação de hipersensibilidade.

Caracteriza-se por intenso processo inflamatório contíguo ao local da picada podendo perdurar de horas a dias sendo as infecções secundárias raras no caso das abelhas, por ação bacteriostática do veneno. Reações locais extensas podem ser perigosas e até fatais, dependendo do local da picada (face, região cervical, orofaringe, olhos). Uma picada na orofaringe ou língua (abelhas que entram em lata de refrigerante ou copo e são inadvertidamente ingeridas) pode ser fatal. Uma picada no olho pode levar à atrofia da íris, abscesso, perfuração, glaucoma e alteração de refração.

As reações sistêmicas, de acordo com a intensidade dos sintomas, podem ser:

- Grau I – sintomas leves: urticária, prurido, ansiedade e mal-estar;
- Grau II – um dos sintomas anteriores mais dois ou mais destes: broncoconstrição leve, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia e angioedema (angioedema isoladamente já é considerado grau II);
- Grau III – um dos sintomas anteriores mais dois ou mais destes: dispnéia, estridor respiratório, sibilos, disfagia, disartria, rouquidão, fraqueza, confusão mental e sensação de morte;
- Grau IV – um dos anteriores mais dois ou mais destes: hipotensão, síncope, colapso, cianose e incontinência urinária.

As reações tardias citotóxicas, mediadas por anticorpos e imunocomplexos, podem cursar com vasculites, miocardites, alterações renais, encefalopatias, neurites, doença do soro e anemias hemolíticas. Pacientes com mastocitose sistêmica, mesmo não sensibilizados aos venenos de himenópteros, podem apresentar reações pseudo-alérgicas, caracterizadas pela desgranulação de mastócitos sem a participação de IgE, por ação direta do veneno sobre a membrana celular.

Outra modalidade de reações são as tóxicas, podendo ser divididas em locais e sistêmicas:

Reações Locais: dor localizada, aguda, edema e hiperemia local, prurido e sensação de calor local, desaparecendo após minutos ou horas.

Reações Sistêmicas: ocorrem após a picada de vários insetos, pela grande quantidade de veneno inoculado, pela ação farmacológica dos diversos componentes do veneno, cursando com sintomas gastrointestinais com vômitos, diarreia e dor abdominal, cefaléia, febre, espasmos musculares e até convulsões. Reações fatais não são frequentes, estando associadas com casos de ferroadas em locais críticos como face e região cervical e com número grande de ferroadas, geralmente acima de 300. Os acidentes com abelhas são comuns em apicultores, sendo encontrados nestes indivíduos níveis séricos de imunoglobulina da classe IgG, conferindo proteção contra acidentes mais graves.

A fisiopatologia varia em relação a mecanismos imunológicos e não imunológicos:

- Imunológicos: podem ser por hipersensibilidade tipo I (Letícia, , Comparação entre ImmunoCAP® e teste cutâneo de hipersensibilidade imediata na avaliação da alergia às proteínas do leite de vaca IgE mediada em crianças), tipo II (citotóxica) e tipo III (imunocomplexos), segundo a classificação de Gell e Coombs;
- Não imunológicos: ativação do sistema complemento e produção de anafilatoxinas C3a, C4a e C5a e ação farmacológica dos venenos.

O número de ferroadas que desencadeou o quadro, sua localização e a caracterização se foi uma reação tóxica, local extensa ou sistêmica são informações importantes na classificação e condução do caso. Complementa-se com teste cutâneo (prick test) e a pesquisa de IgE específica (RAST). As 3 perguntas a serem respondidas são: é uma alergia? Qual o inseto responsável? Qual a chance de uma nova reação numa próxima ferroadada?

Juntamente com alimentos e medicamentos, componentes de venenos de insetos são os causadores mais frequentes de reações anafiláticas.

As principais reações dos venenos dos Hymenoptera sociais são as reações inflamatórias e/ou imunológicas em suas vítimas, podendo observar a ocorrência de efeitos sistêmicos (CASTRO et al., 2009). As reações sistêmicas de maior importância médica são aquelas que afetam os sistemas respiratório e/ou circulatório. Em geral, são caracterizadas como reações cutâneas, vasculares ou respiratórias. As reações

cutâneas que afetam somente a pele se manifestam como urticária, angiodema, coceira, inchaço ou eritema. As reações vasculares envolvem o sistema circulatório, muitas vezes com queda de pressão arterial e aumento da permeabilidade vascular. Essas reações podem levar à inconsciência e desmaios. Já as reações respiratórias, consistem em inchaços ou aumento de fluídos no sistema respiratório. São caracterizadas por dificuldade de respirar, espirros, edema de glote, contração do pulmão, displasia e asma. Em pacientes sensíveis, podem ocorrer ainda, desordens gastrointestinais, cólicas, diarreia, náusea, vômito, incontinência, dor de cabeça, calafrio e febre (SCHMIDT, 1986; OLIVEIRA, 2000). A maioria das reações alérgicas ocasionadas por ferroadas de vespas se deve ao desencadeamento de reações imunológicas, locais e sistêmicas. Porém, reações não alérgicas também ocorrem devido à toxicidade direta do veneno (CASTRO et al., 2009). Ocorrem vários eventos consequentes das ferroadas de vespas, tais como pruridos locais, urticária, angiodema, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais, perda de memória e tontura. As reações sistêmicas são os quadros mais agravantes, os quais envolvem hipotensão, aritmia, bronco espasmos, paradas cardíacas e respiratórias e morte do paciente (REISMAN et al., 1989; FREEMAN, 2004).

A ordem Hymenoptera é composta por aproximadamente 200.000 espécies de abelhas, vespas e formigas. A maioria desenvolveu glândulas especializadas na produção de veneno e um aparelho de ferroar, os quais podem ser utilizados tanto na caça de presas quanto em sua própria defesa (STEEN et al., 2005). Os insetos da ordem Hymenoptera podem ser classificados em dois grupos, de acordo com sua história evolutiva: social e solitário. 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, *Insect Venom Peptides*). A maioria dos Hymenoptera solitários desenvolveu um veneno especializado, principalmente para causar paralisia das presas, permitindo assim, o desenvolvimento de suas larvas em suas próprias presas. Sob o ponto de vista funcional o aparelho de ferrão dos Hymenoptera Aculeata pode ser dividido em duas partes: a primeira é formada por uma estrutura muscular e quitinosa que possibilita a introdução do ferrão e consequentemente a injeção do veneno; a segunda é constituída por uma porção glandular que é responsável pela produção e armazenamento do veneno (SNODGRASS, 1956). O veneno é produzido por glândulas secretoras e fica armazenado no reservatório sob a forma de precursores, sendo ativados posteriormente (PALMA et al., 1994). 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. Os Aculeata mais primitivos atualmente são representados pelos Scolioidea, vespas escavadoras que parasitam larvas de besouros e algumas 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 (CHAUDNETTO et al., 1994). Na literatura, são encontradas diversas propostas de divisão das vespas em superfamílias. De acordo com a proposta de Brothers e Carpenter (1993), as vespas pertencentes ao grupo dos Hymenoptera Aculeata estão divididas em três 24 superfamílias: Chrysidoidea, Apoidea e Vespoidea. A família Vespidae é uma subdivisão da superfamília Vespoidea, e apresenta a totalidade dos casos conhecidos de eusociabilidade em vespas, com mais de oitocentas espécies eusociais. Essa família de vespas é composta por seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, das quais três são encontradas no Brasil, as subfamílias Masarinae, Eumeninae e Polistinae. A subfamília Polistinae é representada por três tribos: Polistini, Epiponini e Mischocyttarini, sendo a tribo Epiponini constituída por vinte gêneros e 216 espécies, dentre as quais está localizada a espécie *Polybia paulista* (CHAUDNETTO et al., 1994; CASTRO et al., 2009). A vespa social *Polybia paulista*, conhecida popularmente como “paulistinha”, é uma espécie muito agressiva que causa muitos acidentes por ferroadas todos os anos no Estado de São Paulo. Possui hábitos urbanos, os seus ninhos são fixados diretamente ao substrato, sem pedúnculo, e os favos são colocados horizontalmente, um abaixo do outro, com um envelope protetor ovóide circundando-os (RICHARDS, et al., 1951). As fundações de novos ninhos ocorrem o ano todo independente das condições climáticas.

O Brasil apresenta um dos maiores números de espécies de vespas sociais de todo o planeta (RICHARDS, 1978). Mais de quatrocentas espécies já foram descritas. As espécies brasileiras são tipicamente neotropicais, sendo seus venenos muito diferentes daqueles encontrados nas espécies de clima temperado (REISMAN et al., 1984; CASTRO et al., 2009).

Atualmente, os venenos dos Hymenoptera sociais são estudados para uma melhor compreensão dos processos alérgicos ocasionados por vespas, abelhas e formigas. Sabe-se que as ferroadas desses insetos podem induzir reações alérgicas e ocasionalmente, anafilaxias fatais (FERNANDEZ et al., 1992). Estimasse que entre 9.3% e 28.5% da população mundial apresenta sensibilização aos venenos desses insetos (ANTONICELLI et al., 2002), o que justifica o crescente interesse no

conhecimento da estrutura e função dos componentes do veneno, 25 sobretudo no campo da alergia e imunologia clínica (ROSS et al., 2000; CASTRO et al., 2009).

Dados do ano de 2009 fornecidos pelo Ministério da Saúde, demonstram que foram registrados 6.445 acidentes por Hymenoptera sociais com uma incidência de 3.4/100 mil habitantes em todo o Brasil. Isso se deve não só ao aumento no número de procura por atendimentos e registros nos postos de saúde, mas também ao crescimento da urbanização e expansão rural possibilitando maior contato do homem com os ninhos desses insetos.

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014*	2015*	2016*	TOTAL
	Região Norte	1	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	3	3	0	1	0	18
	Roraima	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	2	1	0	0	6
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	3
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Região Nordeste	1	0	1	1	0	4	2	13	2	12	10	10	3	10	4	17	9	98
Maranhão	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	4
Piauí	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	2
Ceará	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	6
Rio Grande do Norte	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	7
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	0	0	1	0	0	0	7
Pernambuco	0	0	0	1	0	1	0	1	0	5	2	6	1	4	1	4	3	29
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	4
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
Bahia	0	0	0	0	0	0	1	8	0	3	5	1	2	3	1	6	3	33
Região Sudeste	1	4	5	3	6	3	4	8	4	9	9	6	13	11	11	10	15	122
Minas Gerais	0	3	5	0	3	1	3	5	2	4	5	1	7	4	7	7	8	60
Espírito Santo	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	5
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3	5
São Paulo	1	1	0	2	3	2	1	1	1	5	4	3	5	7	4	3	4	47
Região Sul	0	1	3	2	1	5	7	9	4	9	6	12	8	11	14	5	7	104
Paraná	0	0	2	1	0	1	2	7	3	5	5	5	4	6	12	4	5	62
Santa Catarina	0	1	1	0	0	3	4	1	1	3	0	3	2	1	1	1	1	28
Rio Grande do Sul	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	4	2	4	1	0	1	19
Região Centro-Oeste	0	0	4	1	2	0	0	0	0	1	2	0	3	2	2	3	0	20
Mato Grosso do Sul	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	6
Mato Grosso	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
Goiás	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	2	0	1	0	1	0	0	9
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
Brasil	3	5	13	7	9	12	13	33	11	32	27	28	30	37	31	36	31	358
Data do Banco SINAN *Dados sujeitos à revisão																		
19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	27/12/2012	27/12/2012	29/06/2013	29/06/2013	27/12/2013	13/02/2014	31/03/2015	31/03/2017	

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014*	2015*	2016*	TOTAL
Região Norte	18	66	112	87	108	116	149	248	222	307	272	380	440	549	595	560	561	4.790
Roraima	1	3	9	8	13	20	15	37	18	44	41	54	65	60	104	55	64	611
Acre	0	0	0	0	1	6	9	16	18	28	29	53	71	88	90	88	90	587
Amazonas	0	1	2	3	2	5	10	9	6	12	16	23	42	62	20	25	17	255
Roraima	1	27	53	34	23	10	23	29	47	61	27	43	45	53	66	48	82	672
Pará	3	15	12	9	39	34	30	62	25	29	30	49	83	133	83	97	81	814
Amapá	0	0	1	0	0	0	5	4	2	1	0	7	0	0	3	0	2	27
Tocantins	13	20	35	33	30	36	58	93	106	132	129	151	134	153	229	247	225	1.824
Região Nordeste	317	422	404	500	550	624	711	1498	1064	1522	1803	2975	2309	2633	4404	4046	3.255	29.037
Maranhão	5	6	32	89	47	37	13	21	8	16	21	43	28	38	61	64	58	587
Piauí	77	56	27	20	11	21	13	39	26	46	43	69	60	139	186	293	309	1.435
Ceará	0	50	52	45	62	56	86	127	85	153	125	358	230	255	346	222	104	2.416
Rio Grande do Norte	68	59	54	44	34	27	27	24	69	131	166	440	282	350	699	585	431	3.490
Paraíba	13	1	8	18	13	54	47	225	110	112	52	95	89	141	144	113	97	1.332
Pernambuco	70	131	154	150	200	230	290	405	381	416	519	842	692	783	1.428	1.271	981	8.948
Alagoas	46	62	25	59	60	58	64	197	181	252	354	440	362	360	686	496	410	4.112
Sergipe	6	6	5	3	0	4	8	40	31	41	59	92	66	58	74	63	87	643
Bahia	32	51	47	72	123	137	163	420	173	355	464	596	500	509	780	939	718	6.079
Região Sudeste	896	1.115	1.287	1.359	1.878	2.283	2.059	3.596	2.667	2.956	3.163	3.709	4.194	4.683	5.305	5.560	5.282	51.992
Minas Gerais	110	212	291	360	435	547	662	1.047	916	996	1.101	1.258	1.471	1.664	2.221	2.333	2.255	17.879
Espírito Santo	3	8	17	24	62	92	85	136	123	78	168	328	357	470	386	483	404	3.224
Rio de Janeiro	0	3	2	9	18	10	13	53	41	30	33	22	31	50	74	80	74	543
São Paulo	783	892	977	966	1.363	1.634	1.799	2.360	1.587	1.852	1.861	2.101	2.335	2.499	2.624	2.664	2.540	30.346
Região Sul	155	403	583	806	1.047	1.156	1.566	3.426	1.621	2.053	1.884	2.200	2.720	2.548	3.156	2.973	2.874	30.674
Paraná	46	175	187	211	254	386	559	1.423	737	800	744	830	1.217	1.153	1.617	1.595	1.263	13.157
Santa Catarina	95	203	349	513	642	624	772	1.405	576	823	783	791	910	811	832	798	672	11.599
Rio Grande do Sul	14	25	47	82	151	146	235	598	308	430	357	579	593	584	707	580	439	5.875
Região Centro-Oeste	54	70	85	142	143	168	186	215	310	347	329	438	566	443	602	569	519	5.186
Mato Grosso do Sul	4	6	11	18	22	27	23	42	87	85	92	154	252	169	241	251	191	1.675
Mato Grosso	0	8	12	6	11	12	9	34	30	42	27	33	45	32	61	60	58	480
Goiás	9	7	19	53	47	58	83	87	96	121	107	119	167	148	197	187	189	1.694
Distrito Federal	41	49	43	65	63	71	71	52	97	99	103	132	102	94	103	71	81	1.337
Brasil	1.440	2.076	2.471	2.894	3.726	4.347	4.671	8.983	5.884	7.185	7.451	9.702	10.229	10.856	14.062	13.708	11.991	121.676
Data do Banco SINAN *Dados sujeitos à revisão																		
19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	27/12/2012	27/12/2012	29/06/2013	29/06/2013	27/12/2013	13/02/2014	31/03/2015	31/03/2017	

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014*	2015*	2016*
Região Norte	0,1	0,5	0,8	0,6	0,8	1,0	1,7	1,5	2,0	1,7	2,4	2,7	3,2	3,5	3,2	3,2	3,2
Roraima	0,1	0,2	0,6	0,5	0,8	1,3	1,0	2,5	1,2	2,9	2,6	3,4	4,1	3,5	5,9	3,1	3,6
Acre	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,9	1,3	2,4	2,6	4,1	4,0	7,1	9,4	11,3	11,4	11,0	11,0
Amazonas	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,4	0,5	0,7	1,2	1,6	0,5	0,6	0,4
Roraima	0,3	8,0	15,3	9,5	6,0	2,6	5,7	7,3	11,4	14,5	6,0	9,3	9,6	10,9	13,3	9,5	15,9
Pará	0,0	0,2	0,2	0,1	0,6	0,5	0,4	0,9	0,3	0,4	0,6	1,1	1,7	1,0	1,2	1,0	1,0
Amapá	0,0	0,0	0,2	0,0	0,8	0,6	0,3	0,3	0,2	0,0	1,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,3	0,3
Tocantins	1,1	1,7	2,9	2,7	2,4	2,8	4,4	7,5	8,3	10,2	9,3	10,9	9,5				

A utilização de venenos dos Hymenoptera sociais para diagnósticos e tratamento de reações alérgicas a ferroadas desses insetos foram introduzidos no final dos anos 70 (JOHANSSON et al., 2001). Métodos de diagnósticos de alergia são extensivamente aplicados para auxiliar no tratamento de pacientes sensíveis ao veneno desses insetos. História clínica de reação sistêmica após uma ferroadada de insetos venenosos, teste de pele intradermal, sorologia para quantificação de IgE-específica e imunoterapia específica anti-IgEs são alguns dos métodos empregados (HAMILTON et al., 2004). Os tratamentos utilizados nos processos de sensibilização de pacientes são processos de imunoterapia específica, onde pequenas doses de veneno bruto são injetadas no indivíduo alérgico. A imunidade ocorre quando há um aumento de anticorpos IgG e a diminuição de IgE no organismo do indivíduo alérgico (King, 1996, Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy). Estudos demonstraram que alguns pacientes sensibilizados por esses insetos não apresentaram nenhum tipo de sintoma, porém testes demonstraram a presença da IgE-específica, mostrando que os mesmos estão predispostos a desenvolver reações alérgicas em um futuro acidente (NITTNER-MARSZALSHA et al., 2004).

Atualmente, o diagnóstico de alergias e os processos de imunoterapia específicos aos venenos de Hymenoptera sociais são elaborados com extratos brutos, os quais geralmente são composições muito complexas, constituídos de um grande número de proteínas. Muitas vezes não é possível determinar a composição exata dos venenos; além disso, fatores naturais como degradação das proteínas e heterogeneidade da origem dos alérgenos, podem acarretar problemas durante os diagnósticos de alergia e processos de imunoterapia (NIEDERBERGER et al., 2004). Os extratos comercialmente disponíveis para a realização dos testes são provenientes de outros países e, em muitas ocasiões como é o caso das vespas, diferem das espécies existentes no Brasil (PALMA et al., 1992). O desenvolvimento de extratos específicos para o tratamento de pacientes sensíveis ao veneno de vespas se faz necessário, uma vez que, podem existir proteínas no veneno que causam lesões teciduais e/ou ações farmacológicas indesejáveis, porém sem apresentar qualquer imunoreatividade. Testes realizados no Brasil com extratos comerciais oriundos de venenos de espécies de vespas do hemisfério Norte podem levar pacientes sensibilizados a apresentarem testes cutâneos do tipo “falso-negativo” (YEE et al., 1997; ESHER et al., 2001; ANTONICELLI et al., 2002)

Os insetos da ordem Hymenoptera causadores de alergia pertencem a subordem *Apocrita* que compreende as superfamílias *Apoidea* – abelhas (subfamílias *Apinae* e *Bombinae*) e *Vespoidea* (subfamílias *Vespinae*, *Polistinae*, - vespas, *Formicinae* e *Myrmicinae* - formigas).

Os principais insetos causadores de reações alérgicas no Oeste e centro europeu são as abelhas *Apis mellifera* e as vespas da espécie *Vespula vulgaris*. No sul da Europa e nos Estados Unidos da América (EUA), reações alérgicas às vespas da subfamília *Polistinae*, como as do gênero *Polistes* spp., são comumente relatadas (Monsalve, 2012, Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization). Na Europa, reações alérgicas a formigas são raras enquanto nos EUA e Austrália são de grande importância sendo que a *Solenopsis invicta* e a *Myrmecia pilosula* são as espécies mais importantes, respectivamente (Brown, 2003, Prevention of anaphylaxis with ant venom immunotherapy).

No Brasil, existem mais de 500 espécies de vespas, que potencialmente podem provocar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados, sendo duas comumente encontradas e de grande importância médica não só no Brasil, mas na América do Sul, *Polistes* spp. e *Polybia paulista*.

A *Polybia paulista* (Figura 4) é uma vespa agressiva (Ihering, 1896) que causa muitos acidentes com o desencadeamento de alergia (de Oliveira, 1998, Polybitoxins: a group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*)).

Figura 4 - *Polybia paulista*

Sabe-se que as ferroadas desses insetos podem causar reações alérgicas e ocasionalmente, anafilaxias fatais. Em geral, os venenos desses insetos causam dores prolongadas, edema e eritema locais, consequentes de um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos da pele. A dor pode continuar por várias horas e a ardência por alguns dias. Além dessa ação local decorrente das ferroadas, em

muitos casos, podem ser observadas reações alérgicas, e até mesmo anafiláticas, que algumas vezes, chegam a ser letais.

Os principais alérgenos dos venenos de vespas são fosfolipases, hialuronidases, antígenos-5 e serino-proteases. Sendo um dos quatro principais alérgenos, o antígeno-5 é membro de uma superfamília composta de proteínas ricas em resíduos de cisteína, apresentando massa molecular em torno de 23 kDa e função biológica desconhecida, embora muitos estudos demonstrem a sua alergenicidade. Trata-se de um alérgeno frequente, descrito nos venenos de 15 diferentes espécies de vespas, sendo que a similaridade entre suas sequências e suas atividades alergênicas foram amplamente estudados.

Muitos pacientes alérgicos a venenos de vespas exibem reações para mais de um veneno de vespa, o que pode ser causado pela reatividade cruzada de um ou mais alérgenos. A reatividade cruzada é devido aos alérgenos homólogos de diferentes espécies, que estimulam a produção de IgE-específica imunoreativos aos epítomos comuns presentes nesses alérgenos.

Os venenos de vespas sociais são constituídos por uma mistura complexa de compostos de baixa massa molecular, peptídeos biologicamente ativos e proteínas, responsáveis pelas dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas e sistêmicas (ESHER et al., 2001; SANTOS et al., 2007). Os alérgenos encontrados nesses venenos apresentam a propriedade de induzir o sistema imune a produzir anticorpos com elevada especificidade, e, desencadear sintomas alérgicos em pacientes sensibilizados (AALBERSE, 2000). As principais proteínas alergênicas dos venenos de vespas são fosfolipases, hialuronidases, antígenos-5 (HOFFMAN, 2006; SANTOS et al., 2007) e serino-proteases (McNAIRY et al., 2000). São proteínas antigênicas de elevada massa molecular que, quando injetadas durante o ato de ferroar, iniciam uma resposta imune peculiar, sensibilizando alguns indivíduos. A fosfolipase hidrolisa os fosfolipídios das membranas biológicas, conduzindo à formação de poros e lise celular (DOTIMAS et al., 1987; SANTOS et al., 2007). A ação hidrolítica dessas enzimas é auxiliada pelas atividades lipásica, esterásica e fosfatásica, que atuam no processo de lise celular, destruindo-as. Dentre os Hymenoptera, 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). A fosfolipase A1 do veneno da vespa social *Polybia paulista* foi purificado, sequenciado e caracterizado estruturalmente em estudos realizados em nosso laboratório. Essa proteína apresenta uma identidade de 53-82% com as fosfolipases de espécies de vespas do hemisfério

norte já estudadas. A sua estrutura tridimensional, determinada através da modelagem molecular por homologia, demonstra que essa molécula possui 4 hélices- α (23%) e 6 folhas- β

29 (28%). Ainda nesse estudo foi determinado que essa proteína apresenta ação hemolítica semelhante à cardiotoxina presente no veneno da *Naja naja atra* (SANTOS et al., 2007).

A hialuronidase é uma glicoproteína de 45 kDa (KOLARICH et al., 2005), constitui um grupo de enzimas que hidrolisa o ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molecular que se localiza no interstício celular e possui a propriedade de manter a adesão celular. Pela ação da hialuronidase, o ácido hialurônico 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). Nos estudos de Skov et al. (2006), a hialuronidase do veneno da vespa *Vespula vulgaris* foi bioquimicamente caracterizada sendo determinada a sua estrutura tridimensional por cristalografia de raio X, a qual apresenta 324 resíduos de aminoácidos e possivelmente de quatro a cinco sítios de glicosilação.

Descrito nos venenos de diferentes espécies de vespas sociais, o antígeno-5 é um alérgeno com função biológica desconhecida, porém, muitos estudos demonstram a sua alergenidade. Santos et al. (2010), em estudos realizados em nosso laboratório, identificaram 6 isoformas do antígeno-5 no veneno da vespa *Polybia paulista* que se mostraram imunogênicos ao reagirem com IgE-específica presente no soro de pacientes sensíveis ao veneno da vespa *P. paulista*.

A serino-protease foi descrita como alérgeno sendo identificada nos venenos das vespas *Polistes dominulus*, Pol d 4, e *Polistes exclamans*, Pol e 4 com 33 kDa, e também no veneno de *Apis mellifera*, Api m 7 com 39 kDa (McNAIRY et al., 2000; WINNINGHAM et al., 2004; IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, www.uniprot.org).

A análise proteômica do veneno da vespa social *Polybia paulista*, estudo realizado em nosso laboratório, revelou que além das proteínas alergênicas clássicas dos Hymenoptera, foram identificadas outras proteínas nunca descritas nesses venenos como arginina quinases, proteínas de choque térmico, tropomiosina, alfa glicosidase e superóxido dismutases (SANTOS et al., 2010). Pacientes alérgicos a venenos de vespas podem apresentar reações para mais de um veneno de vespa, o que pode ser ocasionado pela reatividade cruzada de um ou mais alérgenos, devido à similaridade entre suas sequências primárias, uma vez que os anticorpos são

produzidos contra regiões altamente conservadas (BARLOW et al., 1986; KING et al., 1996). Dessa forma, é inquestionável a importância da reatividade cruzada entre os venenos de insetos na prática clínica do alergologista, pois estas interações possuem impacto direto sobre o diagnóstico e melhor conduta terapêutica (CASTRO et al., 2009). A reatividade cruzada foi observada entre as hialuronidases de abelhas e vespas (HOFFMAN, 2006). Entre as proteínas dos venenos de vespas européias do gênero *Polistes* foi estudada por testes sorológicos, os quais demonstraram a similaridade dos alérgenos dessas espécies. Um grau menor de similaridade foi demonstrado entre os venenos das vespas dos gêneros *Dolichovespula* e *Vespula* (PANTERA et al., 2003). Em estudos de Castro et al. (1994) a comparação dos constituintes moleculares do veneno de *Apis mellifera* e da vespa *Polistes versicolor* demonstraram uma baixa reatividade cruzada entre os venenos destas espécies. Porém, o que chamou atenção foi a alta incidência de “falso-negativos” durante a determinação de IgE-específica para a vespa *P. versicolor*, quando utilizados extratos de venenos de vespas de clima temperados (Europa e EUA). As proteínas fosfolipase A1, antígeno-5 e hialuronidase do veneno da vespa *Polybia paulista* demonstraram reatividade cruzada com os venenos da vespa *Agelaia pallipes pallipes* e da abelha *Apis mellifera*, sendo que o antígeno-5 se mostrou imunoreativo em todos os experimentos (SANTOS, 2006).

O antígeno-5 é um alérgeno frequente, descrito nos venenos de diferentes espécies de vespas sociais pertencentes aos gêneros *Polistes*, *Dolichovespula*, *Vespa*, *Vespula* e *Polybia* (HOFFMAN, 2006; SANTOS et al., 2010). Com exceção do gênero *Polybia*, todos os outros são gêneros pertencentes ao hemisfério Norte. Esse alérgeno é membro de uma superfamília, CAP, composta por proteínas ricas em resíduos de cisteína (CRISP – cysteine rich secretory proteins), Antígeno-5 e proteínas relacionadas à patogenicidade em plantas (Pathogenesis-related – Pr 1) (GIBBS, et al., 2008), apresenta massa molecular em torno de 23 kDa e função biológica desconhecida (KING et al., 1990). Nos venenos de vespas sociais do hemisfério norte, a estrutura primária e os aspectos imunológicos do antígeno-5 têm sido extensivamente estudados (PIRPIGNANI et al., 2002; PANTERA et al., 2003). Esses estudos mostram que a identidade entre as sequências do antígeno-5 de vespas do mesmo gênero é de 98%, enquanto que entre as sequências de gêneros diferentes, como *Vespula* e *Polistes*, esse valor é de 57%. A sequência N-terminal desses alérgenos apresentou elevada identidade entre os antígenos-5 dos venenos de vespas já estudados (HOFFMAN, 1993). Nos estudos de Cascone et al. (1995) e Pirlpignani et al. (2002), com o veneno da vespa *Polybia scutellaris rioplatensis*, o antígeno-5 foi

isolado e caracterizado estruturalmente. Esse alérgeno apresenta 207 resíduos de aminoácidos, dos quais 8 são resíduos de cisteína formando 4 pontes de dissulfeto, massa molecular em torno de 23 kDa e ponto isoelétrico em torno de 9.

A estrutura tridimensional do antígeno-5 do veneno da vespa *Vespula vulgaris* foi determinada por cristalografia de raio X, revelando que a mesma apresenta estrutura secundária composta por 5 hélices- α e 4 folhas- β (HENRIKSEN et al., 2001). Nos estudos de Santos et al. (2010), realizados em nosso laboratório, foram identificadas 6 isoformas do antígeno-5 e uma do alérgeno Sol i 3 (análogo do antígeno-5 em formigas) no veneno da vespa *P. paulista* por uma abordagem proteômica. Além disso, também foi demonstrada elevada similaridade entre o antígeno-5 de *P. paulista* e *P. scutellaris rioplatensis*. A elevada identidade entre as sequências primárias dos antígenos-5 das várias espécies de vespas sociais promove uma ampla reatividade cruzada entre as diferentes espécies. O antígeno-5 do veneno da vespa *P. Paulista* demonstrou reatividade cruzada com os venenos da vespa *Agelaia pallipes pallipes* e da abelha *Apis mellifera* sendo imunoreativo em todos os experimentos realizados (SANTOS, 2006). Os antígenos-5 de formigas e de vespas não exibem reatividade cruzada entre si, porém tem sido observada reatividade cruzada entre antígenos-5 de vespas com proteínas da família CAP de outros animais e plantas (KING et al., 1996; HOFFMAN, 2006). Estudos com soros de pacientes não alérgicos a venenos de vespas, utilizando testes cutâneos (RAST- Radioallergosorbent test), demonstraram uma reatividade cruzada entre o antígeno-5 (Dol m 5) presente no veneno da vespa *Dolichovespula maculata* e proteínas de plantas, relacionadas à defesa contra patogenicidade (PRPs) causada pelo vírus mosaico do tabaco e pelo vírus mosaico do tomate. Comparando-se as sequências primárias de Dol m 5 com aquelas das proteínas de defesa relacionadas à patogenicidade desses vírus em plantas, verificou-se que, 28% das mesmas eram conservadas. Evidentemente, ao consumir produtos a base de tomate e/ou pelo hábito de fumar, estes pacientes desenvolveram anticorpos contra as PRPs, que por sua vez apresentaram reatividade cruzada com Dol m 5 da *Dolichovespula maculata* (KING, 1989).

Sabe-se que essa reatividade cruzada é devido aos alérgenos homólogos de diferentes espécies e organismos que estimulam a produção de IgE-específica imunoreativos aos epítomos comuns presentes nos alérgenos (HOFFMAN, 1985; CASTRO et al., 2009), o que impossibilita um diagnóstico preciso já que este é baseado na detecção da especificidade IgE-alérgeno. Sendo assim, a investigação dos epítomos de interação com a IgE em alérgenos é um passo fundamental para o conhecimento das bases moleculares da fisiopatologia das doenças alérgicas.

O veneno dos insetos da ordem Hymenoptera é composto por uma mistura de componentes de baixa massa molecular como as amins biogênicas, peptídeos básicos, toxinas e proteínas de alto peso molecular que podem variar dependendo da estação do ano. Muitos destes componentes têm atividade enzimática e juntamente com uma variedade de outros componentes podem contribuir para a sensibilização, sintomas alérgicos e para o sucesso da imunoterapia (Ollert, 2015, Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics).

Os peptídeos e proteínas presentes nestes venenos têm sido exaustivamente estudados na área médica, não somente pelas possibilidades terapêuticas destes mas também pela intensidade e gravidade das reações alérgicas desencadeadas pelos mesmos (de Graaf, 2009, Bee, wasp and ant venomomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy.).

Desde 1998 o veneno de *Polybia paulista* é alvo de estudos por conta da grande importância farmacológica de alguns componentes (de Oliveira, 1998, Polybitoxins: a group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista* .). Em 2007 foi realizado o primeiro estudo para analisar o potencial alergênico de alguns destes componentes, já descritos como alérgenos em outras espécies de vespas (Santos, 2007, Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). Desde 2010, o proteoma do veneno de *Polybia paulista* foi publicado e algumas proteínas já descritas como alérgenos foram identificadas (dos Santos, 2010, Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism.), bem como outras proteínas ainda não descritas como alergênicas, evidenciando o potencial alergênico deste veneno.

Dentre os insetos da ordem Hymenoptera, existem também aqueles não relacionados com o desenvolvimento da alergia, como é o caso da *Polybia scutellaris*.

A *Polybia scutellaris* é uma vespa Sul americana encontrada principalmente na Argentina e no Uruguai, no entanto, ela não é considerada clinicamente relevante.

Embora a função biológica do antígeno-5 seja ainda desconhecida, muitos estudos demonstram a sua alergenicidade. São as proteínas mais abundantes nos

venenos de vespas frequentemente associadas a respostas alérgicas em seres humanos (BOHLE et. al., 2005). Devido à diversidade evolutiva das proteínas pertencentes à superfamília CAP, várias relações funcionais foram propostas para essas proteínas, como a regulação do sistema imune (GIBBS, et. al., 2008). O antígeno-5, inicialmente identificado em formigas e vespas, forma uma clade distinta

dentro dessa superfamília. Posteriormente também identificado no intestino médio de *Drosophila* (KOVALICK et. al., 1998), e secretado na saliva de carrapatos (MANS et. al., 2008), flebotomíneos (CHARLAB et. al., 1999) e mosquitos (CALVO et. al., 2007).

Em carrapatos, moscas e mosquitos (MANS et. al., 2008; VALENZUELA et. al., 2002), o antígeno-5 compõe um coquetel de proteínas salivares, as quais teriam a função de supressão do sistema imune do hospedeiro ou a prevenção da coagulação, com a finalidade de se prolongar a alimentação (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003).

Em estudos de Asojo et al. (2005), com a proteína Na-ASP-2 (pertencente à família CRISP-1, presente no parasita nematóide *Necator americanus*, verificouse uma elevada similaridade na sequência primária e estrutura tridimensional dessa proteína com o antígeno-5 do veneno de vespas. Além disso, demonstrouse o uso em potencial dessas proteínas no desenvolvimento de vacinas, as quais induziriam anticorpos ao bloquear ou interferir na interação receptor-ligante/vítimaanimal, interrompendo a habilidade do sistema imune da vítima no desencadeamento de respostas de ativação celular.

A frequência de reações alérgicas a picada de himenópteras varia de 0,4 a 4%, podendo acometer qualquer idade, mas com aumento de incidência em adultos jovens do sexo masculino, possivelmente pelo maior contato dos homens com estes insetos. Cerca de 30% dos pacientes alérgicos a veneno de himenópteras têm antecedentes de atopia.

A rotina clínica para diagnóstico de alergia parte de uma anamnese detalhada e envolve testes sorológicos e/ou testes cutâneos para confirmação da reatividade específica de IgE, utilizando extratos alergênicos da fonte natural.

O teste sorológico *in vitro* mais utilizado é o ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), que consiste em um sistema fechado e padronizado de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) no qual o extrato alergênico está depositado em uma membrana acoplada a um recipiente próprio e descartável, comercializado apenas para o uso no equipamento.

Existem algumas limitações dos testes diagnósticos com extratos naturais. Os extratos alergênicos naturais geralmente são compostos por misturas mal definidas de proteínas alergênicas, não alergênicas e com reatividade cruzada, o que dificulta a identificação correta do alérgeno desencadeador da doença em pacientes sensibilizados a duas ou mais fontes alergênicas. Além disso, existe a dificuldade de padronização dos extratos alergênicos em termos de qualidade e quantidade de alérgenos porque muitas vezes, alérgenos importantes na fonte natural não estão representados nos extratos alergênicos por serem lábeis e perdidos durante os

processos de preparação do extrato (van Ree, 2008, The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification.).

Outra limitação do diagnóstico com extratos naturais ou com proteínas purificadas da fonte natural é a presença de glicosilação natural nas proteínas. A glicosilação é uma modificação pos-traducional comumente encontrada em vegetais e venenos de insetos. Modificações pós-traducionais (PTM, do inglês *post-translational modification*) consistem na adição de grupos químicos funcionais a cadeia polipeptídica como, por exemplo, fosfato, acetato, sulfato, metil e de carboidratos alterando a as características estruturais das proteínas e influenciando na função.

Os tipos de glicosilação mais importantes relacionados ao diagnóstico de alergia são a beta- (1,2) -xilose e a alfa- (1,3) -fucose. Estes carboidratos não são encontrados em humanos então quando em contato com os componentes do sistema imunológico humano, funcionam como antígenos. São chamados de determinantes de carboidratos de reação cruzada (CCD, do inglês *cross-reactive carbohydrate determinants*) porque pacientes alérgicos produzem IgEs específicas para estes CCDs que reconhecem estes ligados as proteínas, dando resultado falso positivo nos testes laboratoriais (Jappe, 2006, In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition). No entanto, os CCDs não possuem relevância clínica (Altmann, 2007, The role of protein glycosylation in allergy;Brehler, 2013, Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy).

Todos estes problemas podem ser contornados com o uso de alérgenos recombinantes, os quais não possuem CCDs, em plataformas de diagnóstico molecular.

No final dos anos 1900 houve um grande avanço nas técnicas de diagnóstico de alergia que ocorreram devido à identificação por espectrometria de massas e o isolamento cromatográfico das primeiras moléculas alergênicas nativas. Posteriormente, com a utilização de métodos de clonagem de DNA recombinante foi possível produzir estes alérgenos. Antes dessa época, os extratos naturais foram os únicos reagentes disponíveis para identificar a presença de anticorpo IgE no sangue ou na pele como um marcador de sensibilização alérgica (Marsh, 1975, Ragweed allergen Ra5: a new tool in understanding the genetics and immunochemistry of immune response in man;Chapman, 1980, Purification and characterization of the major allergen from Dermatophagoides pteronyssinus-antigen P1;King, 1976, Allergens of honey bee venom).

Quando os primeiros alérgenos de pólen (Marsh, , Ragweed allergen Ra5: a new tool in understanding the genetics and immunochemistry of immune response in man) (Marsh, 1975, Ragweed allergen Ra5: a new tool in understanding the genetics and immunochemistry of immune response in man), ácaro (Der p 1) (Chapman, 1980, Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1), e veneno (Fosfolipase A2 e Api m 1) (King, 1976, Allergens of honey bee venom) foram identificados, foi um marco na pesquisa em alergia porque houve o início de uma nova era, a da alergologia molecular, na qual a especificidade da resposta imune de IgE , mesmo ao nível molecular , podia ser quantificada utilizando alérgenos individuais purificados ou produzidos na forma recombinante.

Os alérgenos recombinantes são proteínas alergênicas produzidas em vetores de expressão heterólogos, através da técnica de DNA recombinante. Devem apresentar características físico-químicas e imunológicas comparáveis ao alérgeno natural (Radauer, 2014, Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences; Egger, 2009, Development of recombinant allergens for diagnosis and therapy).

Após sua produção e caracterização, devem ser reconhecidos pelo subcomitê de nomenclatura de alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia (IUIS, do inglês *International Union of Immunological Societies*), no qual recebem uma sigla padronizada que é a abreviação do nome científico. A sigla contém 3 ou 4 iniciais do gênero, 1 ou 2 letras identificando a espécie e um numeral. Originalmente, eram designados números consecutivos para cada novo alérgeno. Durante as últimas décadas, com o avanço das técnicas de bioinformática, foi possível classificar os alérgenos em famílias de proteínas as quais os membros são evolucionariamente relacionados, com sequências e estruturas similares e em alguns casos apresentam reatividade cruzada entre si, como é o caso do antígeno 5 (Monsalve, , Expression of yellow jacket and wasp venom Ag5 allergens in bacteria and in yeast) (Radauer, 2014, Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences).

Por exemplo, no caso do alérgeno Pol a 5 de *Polistes annularis*, o nome do alérgeno se inicia pela sigla Pol (gênero *Polistes*), a (espécie *annularis*) e a sigla termina com o numeral 5 porque o alérgeno é similar aos Ag5 de outros himenópteros.

Devido ao fato do diagnóstico por componentes ser de muita importância na decisão da abordagem de tratamento de pacientes alérgicos, existe um grande interesse na identificação, caracterização e quantificação dos alérgenos presentes em extratos naturais de diversas fontes alergênicas para que sejam produzidos na forma

recombinante e utilizados em testes diagnósticos e imunoterapia (Valenta, 2007, Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area).

Atualmente existem testes que empregam o princípio de diagnóstico com múltiplos componentes (CRD, do inglês *component-resolved diagnostics*) em matrizes miniaturizadas, no qual centenas de componentes alergênicos recombinantes ou purificados são depositados na fase sólida do teste. O mais comumente utilizado pelos médicos é o ImmunoCAP ISAC® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) que permite identificar a reatividade de IgEs específicas aos alérgenos da fonte suspeita de causar a alergia (Ferrer, 2009, Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique.).

Este tipo de diagnóstico por componentes está se desenvolvendo e cada vez mais novos alérgenos purificados ou produzidos por técnicas de DNA recombinante são incluídos nos painéis de alérgenos, aumentando as chances de identificação da molécula que sensibilizou o paciente e iniciou a reação alérgica.

Entretanto, esta reatividade nem sempre corresponde aos sintomas clínicos. Por isso, os resultados de testes *in vitro*, juntamente com testes cutâneos, devem ser criteriosamente avaliados pelo médico especialista, considerando a história clínica do paciente para o diagnóstico final (Asero, 2007, IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives.). Além disso, resultados falsos positivos, bem como falsos negativos, podem ser obtidos com extratos de diferentes fontes. Entretanto, o diagnóstico por moléculas, se realizado a partir de uma história clínica detalhada, pode ser utilizado como busca inicial no caso de pacientes multisensibilizados, ou quando existem muitas fontes alergênicas suspeitas, ou ainda para a detecção de possíveis reatividades cruzadas.

A história clínica de acidente e a correta identificação do inseto agressor são fatores substanciais para o diagnóstico de alergia a himenópteras, porém muitas vezes o paciente não consegue identificar o inseto agressor e a correta interpretação dos testes laboratoriais pelo médico se torna crucial para a decisão da conduta de tratamento. Deve ser levado em consideração que dos pacientes com história convincente de acidente com himenópteras, 10% podem apresentar resultado negativo nos testes laboratoriais enquanto que dos pacientes que não tem história clínica bem definida, 50% apresentam resultados positivos nos testes laboratoriais para mais de um veneno (Ollert, 2015, Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics).

Em se tratando do diagnóstico de alergia a veneno de himenópteras, os extratos disponíveis para testes no ImmunoCAP® são de veneno de abelha (*Apis mellifera*), formiga (*Solenopsis invicta*) e das vespas *Vespula vulgaris*, *Polistes* spp., *Vespa crabro* e *Dolichovespula* spp.

Nem sempre é fácil caracterizar o inseto envolvido pois é frequente o paciente procurar o atendimento algum tempo depois de ocorrido. Outro fator é a confusão entre abelhas e vespas. Os testes são o prick test e o intradérmico. As diluições variam de 0,01mg/ml a 10mg/ml, sendo necessário determinar o “end point” que é a mais baixa concentração capaz de ocasionar um teste positivo. Na prática isto é feito através do prick test, utilizando o mesmo extrato que vai ser usado na imunoterapia, quando indicada. Inicia-se o prick com diluições maiores (1/1.000.000), depois se reduz 1/100.000, 1/10.000, 1/1.000 e assim sucessivamente. Alcançado o “end point” este deve ser diluído a dez vezes para o teste intradérmico e 1.000 vezes para o início da imunoterapia. Deve ser sempre iniciado pela técnica de prick test (nunca iniciar por teste intradérmico pelo risco de reações graves) e sempre acompanhado de controle positivo (histamina) e controle negativo (SF 0,9% ou diluente). Falsos positivos podem ser encontrado em altas concentrações de veneno o falsos negativos quando do uso de anti-histamínicos e no período refratário, cerca de 2 semanas após a ferroad. Pesquisa de IgE específica também pode ser solicitada, com a vantagem de não ter o risco de reações. O RAST é negativo em cerca de 20% das pessoas com teste cutâneo positivo e cerca de 10% das pessoas com RAST positivo têm testes cutâneos negativos.

A reatividade cruzada de IgE entre diferentes componentes dos venenos de Hymenoptera é comumente observada. Isto pode ser devido a sensibilização primária verdadeira ou devido à reatividade cruzada entre alérgenos homólogos presentes em ambos os venenos que compartilham alérgenos similares ou idênticos. Como é o caso das hialuronidases, dipeptidil peptidases, vitelogeninas e antígenos 5. A relevância clínica destas reações cruzadas é desconhecida.

Em até 50% dos pacientes, a dupla positividade é causada por anticorpos IgE clinicamente irrelevantes contra CCDs. Muitos (embora não todos) os pacientes com dupla sensibilização verdadeira podem ser identificados por meio de alérgenos espécie-específicos em testes diagnósticos por componentes (Hemmer, 2014, [Cross reactions between Hymenoptera venoms from different families`, genera and species]).

A identificação do inseto cujo veneno causou a sensibilização primária em pacientes com teste positivo para *Vespula* e *Polistes* é particularmente importante para diagnóstico e tratamento de pacientes alérgicos a veneno de vespas na Europa. Neste

caso, o diagnóstico por componentes pode identificar diretamente o veneno causador e a reatividade de IgE contra CCD também é descartada, visto que a espécie *Polistes* não apresenta CCDs (Blank, 2013, *Polistes species venom is devoid of carbohydrate-based cross-reactivity and allows interference-free diagnostics*).

Nos últimos anos, várias proteínas têm sido identificadas em venenos de insetos por abordagem proteômica e muitas delas foram descritas como novos alérgenos (Blank, 2011, *Api m 10`, a genuine A. mellifera venom allergen`, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts.*; Blank, 2012, *The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11 are glycosylated components of Apis mellifera venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity*).

O veneno mais bem caracterizado é o da abelha *Apis mellifera*, o que certamente é devido à extraordinária importância da apicultura e, portanto, da abelha como desencadeador de alergia a veneno em todo o mundo. Além disso, os dados detalhados de proteômica do veneno puro (Peiren, 2005, *The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach*) e do genoma (Honeybee, 2006, *Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera*) foram publicados. Dentre os alérgenos do veneno de abelha, os mais bem caracterizados são fosfolipase A2 (Hemmer, , *[Cross reactions between Hymenoptera venoms from different families`, genera and species]*), hialuronidase (Api m 2) e melitina (King, , *Antibody responses to bee melittin (Api m 4 and hornet antigen 5 (Dol m 5 in mice treated with the dominant T-cell epitope peptides)* (Arbesman, 1976, *Allergenic potency of bee antigens measured by RAST inhibition*).

Dentre os venenos de vespas, o de *Vespula vulgaris* e de *Polistes* spp. têm sido estudados exaustivamente e novos alérgenos são identificados e produzidos a cada dia (Ollert, 2015, *Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics*).

O alérgeno de veneno de vespa mais bem caracterizado é o antígeno 5 de *Vespula vulgaris* (Ves v 5), uma proteína de função desconhecida, mas de alta abundância no veneno, cuja estrutura cristalográfica foi resolvida e testes imunológicos foram realizados para o estudo da função desta molécula (Henriksen, 2001, *Major venom allergen of yellow jackets`, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily*). Outros alérgenos deste veneno também já foram produzidos e caracterizados, estes incluem fosfolipase A1 (Ves v 1) e hialuronidase (Ves v 2,0101) (King, 2000, *Structure and biology of stinging insect venom allergens*; Müller, 2002, *Recombinant Hymenoptera venom allergens*).

Várias tentativas em produzir alérgenos recombinantes de himenópteras em *E. coli* foram realizadas, porém em muitos casos a proteína produzida não possuía a

conformação original o que resultava em diminuição da reatividade de IgE. Resultados melhores foram obtidos com a utilização de sistemas de expressão em leveduras e células de insetos que possibilitaram a produção de muitos alérgenos recombinantes de diversas espécies de himenópteros (Monsalve, 1999, Expression of yellow jacket and wasp venom Ag5 allergens in bacteria and in yeast; Monsalve, 1999, Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris* and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast) (Ollert, 2015, Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics).

Apenas alguns componentes alergênicos destes venenos produzidos na forma recombinante foram incluídos na matriz do ImmunoCAP ISAC®. São eles: Fosfolipase A2 de *Apis mellifera* (Eberlein, 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); Ag5 de *Polistes* spp. (rPol d 5) e Fosfolipase A1 e Ag5 de *Vespula vulgaris* (rVes v 1 e rVes v 5, respectivamente) (Ollert, 2015, Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics). Estes componentes também estão disponíveis para o sistema do ImmunoCAP®, os quais podem ser testados individualmente. No Brasil, o sistema único de saúde (SUS) não arca com os gastos do teste de matriz miniaturizada (ImmunoCAP ISAC®), sendo possível testar apenas os componentes disponíveis no ImmunoCAP®.

Apesar da importância da alergia a veneno de *Polybia paulista* no Brasil, não existem extratos nem moléculas recombinantes para diagnóstico e tratamento de pacientes alérgicos. O único extrato disponível é o de veneno de *Polistes* spp., uma das vespas mais comuns no hemisfério norte que também é encontrada no Brasil.

Recentemente foi publicada a análise proteômica do veneno de *Polybia paulista* na qual foram identificadas algumas moléculas reconhecidas por IgE e envolvidas nos mecanismos de envenenamento (antígeno 5, fosfolipase A1, Hialuronidase, Proteína de choque térmico 60, Proteína de choque térmico 90, e Arginina quinase) ainda não descritas como alergênicas (dos Santos, 2010, Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism.).

Análises preliminares do grupo evidenciaram que existem alérgenos ainda não identificados no veneno da vespa *Polybia paulista* e que não reagem cruzadamente com alérgenos presentes nos extratos comercialmente disponíveis.

Dentre as proteínas identificadas, a fosfolipase A1 e o antígeno 5 foram as que chamaram mais atenção, por conta do potencial alergênico destas moléculas comuns

em venenos de vespas de outras espécies também (Arbesman, 1976, Allergenic potency of bee antigens measured by RAST inhibition) (Henriksen, 2001, Major venom allergen of yellow jackets`, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily) (King, 2004, Hymenoptera allergens).

A fosfolipase A1 foi purificada a partir do extrato natural do veneno de *Polybia paulista* e suas características físico-químicas foram analisadas, bem como seu potencial alergênico avaliado através da reatividade IgE específica do soro de pacientes alérgicos. Esta foi a primeira proteína descrita como alergênica no veneno de *Polybia paulista* (Santos, 2007, Purification`, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera`, Vespidae) (dos Santos, 2011, Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*).

Há alguns anos pesquisadores vem trabalhando para produzir a fosfolipase A1 de *Polybia paulista* na forma recombinante para que esta possa ser uma ferramenta para diagnóstico e tratamento dos pacientes alérgicos, porém até hoje não obtiveram sucesso.

O antígeno 5 é uma proteína com função desconhecida e é um componente comum em venenos de insetos da ordem Hymenoptera, descrito como alergênico na maioria deles (Becker, 1994, [Molecular characterization of allergens];Becker, 1994, [Molecular characterization of allergens];Biló, 2005, Diagnosis of Hymenoptera venom allergy;King, 1997, Hornet venom allergen antigen 5`, Dol m 5: its T-cell epitopes in mice and its antigenic cross-reactivity with a mammalian testis protein;King, 2004, Hymenoptera allergens).

Assim como a fosfolipase A1, o antígeno 5 foi descrito como alérgeno do veneno de *Polybia paulista* em 2010 (dos Santos, 2010, Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism.), seus epítomos de células B foram caracterizados (dos Santos-Pinto, 2015, B-cell linear epitopes mapping of antigen-5 allergen from *Polybia paulista* wasp venom) e as modificações pós-traducionais foram avaliadas (Dos Santos-Pinto, 2014, 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*) na tentativa de entender o que o torna uma proteína alergênica.

Pouco se sabe sobre os componentes do veneno de *Polybia scutellaris*, porém em 2012, Vinzón e colaboradores (Vinzón, 2012, A naturally occurring hypoallergenic variant of vespid Antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom as a candidate for allergen-specific immunotherapy) mostraram que o Ag5 presente neste veneno (Vinzón, , A

naturally occurring hypoallergenic variant of vespid Antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom as a candidate for allergen-specific immunotherapy) é uma molécula hipoalergênica, porque foi capaz de induzir a produção de IgG em camundongos e quantidades mínimas de IgE. Estas IgGs produzidas frente a imunização com Poly s 5 apresentaram reatividade cruzada com Pol a 5, Antígeno 5 de *Polistes annularis*, conhecidamente alergênico. Ao mesmo tempo que Poly s 5 induz a produção de quantidades mínimas de IgE, estas IgEs são capazes de induzir pouca liberação de mediadores de basófilos em modelo animal quando comparado com a quantidade de mediadores liberados frente ao Pol a 5 *in vitro*.

O tratamento leva em consideração a profilaxia, orientando o cuidado a evitar locais com concentração dos insetos, evitar perfumes fortes e cuidado com copos com bebidas doces (refrigerante e sucos) e com latas de refrigerantes abertas. Pacientes com risco de reações sistêmicas devem carregar o “kit de emergência” composto de adrenalina, anti-histamínicos e/ou corticosteróides. A ordem de uso deve ser sempre adrenalina (subcutânea), anti-histamínico injetável, de preferência, e depois corticosteróide via injetável. O kit pode ser adquirido em farmácias de manipulação, disponível na maioria dos centros e o paciente deve ser orientado e treinado para o uso correto, havendo relato de reações fatais devido a não utilização correta (técnica de aplicação) das medicações.

A indução e manutenção da tolerância aos alérgenos é uma característica da resposta imune saudável a alérgenos, mas os mecanismos moleculares envolvidos neste processo não estão completamente elucidados. Modelos *in vivo* de exposição a altas doses de alérgenos naturais e imunoterapia demonstraram que a geração de células T reguladoras (Tregs) e B reguladoras (Bregs) são componentes essenciais da indução de tolerância a alérgenos (6–12).

A identificação de tecidos humanos nos quais a indução de tolerância acontece pode ser de grande relevância para o desenho de novas intervenções terapêuticas. As amígdalas humanas têm sido mostradas como órgãos onde os mecanismos imunológicos para a indução de tolerância a alérgenos acontecem durante a imunoterapia sublingual (SLIT) acontecem (7,13,14).

A imunoterapia específica (ITE) continua sendo o único tratamento para as doenças alérgicas com capacidade curativa, mas ainda enfrenta desvantagens relacionadas à eficácia, segurança, longa duração e adesão do paciente (4).

Novas estratégias para superar esses inconvenientes, incluindo adjuvantes alternativos e rotas de administração das vacinas, estão sendo desenvolvidos e

testados em estudos pré-clínicos com modelos in vitro e in vivo e estudos clínicos (15–18).

A imunoterapia específica (ITE) continua sendo o único tratamento para alergia a venenos de himenópteras eficaz até o momento, induzindo tolerância com um índice de proteção que vai de 75 a 98% (Golden, 2007, Insect sting anaphylaxis). É a abordagem terapêutica utilizada há mais de 100 anos para o tratamento das doenças alérgicas (Akdis, 2015, Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens).

Os mecanismos pelos quais a ITE age ainda estão em estudo mas sabe-se que incluem os efeitos de modulação da resposta imunológica predominante na alergia (Th2) para uma resposta do tipo protetora (Th1). Isto acarreta em mudanças nas respostas de anticorpos (IgE e IgG), bem como na inibição da migração dos eosinófilos, basófilos e mastócitos aos tecidos impedindo a liberação dos seus mediadores que causam as reações alérgicas.

As células T reguladoras (Akdis, , Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens) tem um papel fundamental neste processo de indução da tolerância periférica a alérgenos, contribuindo para o controle das respostas imunológicas exacerbadas através da supressão da ativação das células dendríticas que capturam os alérgenos e estimulam a geração de células T efetoras além da supressão direta das células efetoras (Th2 e Th17). Consequentemente, há diminuição da produção de IgEs específicas aos alérgenos e indução da produção de IgG4, sabidamente capaz de ligar-se aos alérgenos bloqueando o mecanismo de hipersensibilidade do tipo I (Akdis, 2015, Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens).

O pré-requisito para o início da imunoterapia deve ser a verificação da ocorrência de uma reação IgE mediada contra o veneno do inseto agressor porque o tratamento desnecessário com mais de um ou até com o veneno errado pode levar a novas sensibilizações e aumentar o risco de reações no paciente, além de ter um custo alto (Juarez, 1992, Specific IgE antibodies to vespids in the course of immunotherapy with *Vespula germanica* administered to patients sensitized to *Polistes dominulus*). Apesar de a ITE ser muito estudada, ainda não existe nenhum marcador preditivo de sucesso para a imunoterapia (Ollert, 2015, Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics).

A imunoterapia específica está indicada nos pacientes que tiveram reação sistêmica anterior, bem caracterizada. O risco de reações sistêmicas em futuras ferroadas, a idade e a gravidade das reações prévias, o grau de exposição e a

presença ou não de IgE específica devem ser ponderados para a indicação da imunoterapia. Reações tóxicas e locais extensas não têm indicação de imunoterapia. Além disto precisa haver uma comprovação de sensibilização por prick test, intradérmico ou RAST. Outros fatores precisam ser ponderados antes da indicação de imunoterapia, como risco de nova exposição e condição financeira.

Pode ser realizada de maneira rápida, iniciando com até quatro injeções diárias (indução) e depois injeções a cada 5 dias (manutenção). É indicado para indivíduos com reações sistêmicas e alto grau de exposição. Deve ser realizado sob internação hospitalar. No método semi-rápido utiliza-se 3 ou 4 injeções por semana (indução) por aproximadamente 2 meses e depois uma injeção por semana (manutenção). No método tradicional faz-se uma injeção por semana (indução) e depois aumenta-se o intervalo de aplicações para até 30 dias, com duração de 3 a 5 anos. Deve sempre ser realizado por profissional treinado e com experiência e em ambiente com suporte para ressuscitação cardiorespiratória. Para a interrupção do tratamento pode se utilizar um nível de IgG específica final cerca de 100 vezes maior que o inicial ou níveis de IgE específica negativados ou muito baixos. Alguns optam pela negatificação dos testes cutâneos, mas isto pode demorar alguns anos.

Considerando as ferramentas diagnósticas e de terapia para os pacientes com anafilaxia a veneno de vespa em nossa região e a abordagem utilizada para diagnosticar esses pacientes propusemos qual seria o tratamento mais adequado ou a dúvida que surgiria na escolha deste tratamento. O esquema proposto encontra-se mostrado na figura 4 e sugere que o veneno da vespa *Polistes* como único extrato disponível para diagnóstico e tratamento dos pacientes com história de alergia por veneno de vespa possa não ser suficiente para a correta conduta clínica nestes casos.

Figura 5 - Esquema de abordagem atual utilizado para diagnóstico e tratamento de pacientes com suspeita de alergia a vespa baseado na história clínica, testes e extratos disponíveis. As condutas que geram dúvidas encontram-se em tracejado.

2. Objetivo geral

Avaliar a necessidade do uso de extrato total e de componentes do veneno da vespa *Polybia paulista* na prática clínica e laboratorial, através de análises *in vivo* e *in vitro*, para o correto diagnóstico e tratamento de pacientes com alergia a vespa em regiões cuja espécie está presente.

2.1 Objetivos específicos

- I. Validar a importância do extrato de veneno da vespa *Polybia paulista* para a distinção de sensibilização inseto específica;
- II. Identificar os alérgenos presentes no veneno da vespa *Polybia paulista*;
- III. Produzir alérgenos recombinantes e caracterizá-los físico-química e imunologicamente;
- IV. Produzir modelos teóricos de estrutura para as moléculas identificadas e produzidas;
- V. Verificar a reatividade cruzada *in vitro* destas moléculas com alérgenos homólogos.

3. Métodos

3.1 Aprovação ética

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) apresentando certificado de apresentação para apreciação ética número 19412514.9.0000.0068. Os indivíduos incluídos neste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

3.2 Perfil de pacientes e controles

Vinte e um pacientes com história clínica de anafilaxia a vespa confirmada ou suspeita foram recrutados neste estudo e acompanhados por médicos alergistas do ambulatório de anafilaxia por venenos de insetos do serviço de alergia e imunologia do HCFMUSP. Nenhum dos pacientes incluídos havia começado o tratamento.

Além disso, 4 indivíduos que apresentaram história de acidente com vespa, porém não tiveram manifestações alérgicas, foram recrutados constituindo o grupo controle.

3.2.1 Avaliação clínica e diagnóstica dos pacientes

Todos os pacientes foram avaliados clinicamente e o diagnóstico foi realizado seguindo as orientações do consenso americano e europeu para pacientes alérgicos a himenópteras, denominado “Hipersensibilidade grave aos insetos: atualização de parâmetro para a prática” publicado em 2011 e atualizado em 2016 (19). O grau de anafilaxia foi determinado segundo o consenso internacional em anafilaxia (20).

3.2.2 Testes cutâneos

Os testes cutâneos foram realizados com o extrato comercial disponível para *Polistes* spp. (catálogo número 6784P53, Hollister-Stier, EUA) e/ou com o extrato de veneno de *Polybia paulista* produzido seguindo um protocolo padronizado (21) como descrito a seguir.

3.2.3 Quantificação de IgE específica

A quantificação de IgE específica aos venenos de vespas e aos componentes disponíveis foi realizada através de ImmunoCAP® (Thermo Scientific, Uppsala, Suécia) para extrato de veneno de *Polistes* spp. (i4) e componentes de antígeno 5 de *Polistes* spp. (Pol d 5 – i210) e de *Vespula vulgaris* (Ves v 5 – i209) utilizando-se soro de pacientes e

controles. O critério de positividade estabelecido pelo fabricante ($>0,35$ kUA/l) foi considerado para as análises.

3.3 Extração de veneno da vespa *Polybia paulista*

A preparação do extrato de proteínas do veneno foi realizada no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) na cidade de Rio Claro, São Paulo, SP – Brasil, seguindo um protocolo padronizado (21).

Para isto, ninhos de *Polybia paulista* foram previamente coletados por um técnico especializado. Os insetos foram anestesiados a -80°C e as glândulas de veneno extraídas através de dissecação (Figura 3). As glândulas foram maceradas com água ultrapura contendo o coquetel de inibidores de proteases Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) a 1 mM (Sigma-Aldrich, EUA). A suspensão foi centrifugada a 10.000 g durante 15 min a 4°C e o sobrenadante foi filtrado por três vezes em filtro de $0,45\ \mu\text{m}$. A dosagem de proteínas totais do extrato foi realizada pelo método de Bradford. O extrato de proteínas totais do veneno de *Polybia paulista* foi liofilizado e conservado a -80°C até o momento da sua utilização.

Figura 6 - Processo de extração de glândulas de veneno da vespa *Polybia paulista*.

3.4 Detecção de IgE específica aos alérgenos dos venenos

3.4.1 ELISA

Placas Maxisorp (Nalge Nunc, Rochester, EUA) foram recobertas com 50µl de uma solução de PBS contendo 4µg/ml do extrato de proteínas do veneno natural de *Polybia paulista* ou do veneno comercial de *Polistes* spp. e incubadas o/n a 4°C. Ligações inespecíficas foram bloqueadas com tampão TBS 0,05% (v/v), pH 7.4 Tween-20 e 1% (m/v) BSA por uma hora e incubadas com soro dos pacientes o/n a 4°C. As IgEs específicas foram detectadas com anticorpos monoclonais anti-IgE humana conjugados com fosfatase alcalina (BD Biosciences, Franklin Laker, NJ) e a reação foi revelada com o uso do substrato fosfato de p-nitrofenila (pNPP) que emite luz amarela passível de ser detectada em leitor ótico a 405nm. As medidas foram realizadas sempre em duplicata e foram considerados positivos os valores de densidade ótica que excederem três vezes o background ou a média dos valores do grupo controle mais 3 vezes o desvio padrão.

3.4.2 Western blotting 1D

A separação inicial das proteínas do extrato bruto foi realizada por eletroforese 1D em gel de poliacrilamida 15%. Cerca de 30µg de proteínas do extrato total de veneno de *Polybia paulista* foram previamente aquecidas a 95°C na presença de Dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*) e de um reagente tiol (2-mercaptoetanol), para desnaturação e quebra das pontes dissulfeto. A amperagem aplicada para a eletroforese foi de 10mA/gel durante 20 minutos ou até a entrada da amostra no gel de resolução e de 30mA/gel até o fim da corrida. Os géis foram corados com Commassie Blue Coloidal (Candiano, 2004, Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis). As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas do gel para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*) em cuba Semi-Dry TE 70 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia). Em um reservatório contendo tampão de transferência [Tris 20 mM pH 8,3, contendo Glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v) e metanol a 10% (v/v)] foi montado um “sanduíche” na seguinte ordem: três folhas de papel de filtro comum, uma membrana, gel e três folhas de papel de filtro comum; este conjunto permaneceu em repouso por 10 minutos para o equilíbrio de todo sistema no tampão de transferência. O conjunto foi então colocado rapidamente na cuba de transferência.

Para detecção de IgE específicas, foram utilizados os soros dos indivíduos incluídos neste estudo. O anticorpo utilizado para a detecção foi o Anti-IgE humana produzido em camundongos (Dias, Peptidome profiling of venom from the social wasp *Polybia paulista*) conjugada à peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*). A detecção das proteínas alergênicas foi realizada por quimiluminescência e documentada utilizando-se o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

3.5 Espectrometria de massas *highthroughput* do veneno de *Polybia paulista*

Na busca de identificar o maior número de proteínas contidas no veneno de *Polybia paulista*, 130 µg de proteínas do extrato total foram digeridas com tripsina utilizando-se o ProteoExtract™ All-in-One Trypsin Digestion Kit (Calbiochem, Gibbstown, EUA). O pool de peptídeos advindos da digestão tripsínica foi analisado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) no equipamento Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Os dados de MS/MS gerados foram então submetidos ao programa PEAKS 7 para serem analisados por *De novo sequencing* (Bin Ma, 2003, PEAKS: powerful software for peptide de novosequencing by tandem mass spectrometry).

Para identificação das proteínas foram utilizados como parâmetros: Homologia contra o Banco Insetos do NCBI; Modificação Fixa – Carbamidometilação; Tolerância de fragmentação dos íons - 0.2; Máximo de modificações pós-traducionais (MPTs) – 4; Limite De novo score (ALC%) -15; Limite de hit para peptídeos (-10logP) - 30.0; *Peaks run ID* – 8; *Merge Options* - no merge; Opções de precursor – corrigida; Carga - 1 a 4; Qualidade do Filtro - >0.65; Fonte de Íon – ESI (nano-spray); Modo de Fragmentação – energia alta CID (íons y e b), *MS Scan Mode* - FT-ICR/Orbitrap; *MS/MS Scan Mode* - FT-ICR/Orbitrap.

3.6 Similaridade entre as sequencias dos alérgenos recombinantes produzidos e alérgenos já descritos este item esta deslocado, tem q vir depois da produção do recombinante.

A análise da similaridade entre as sequencias de aminoácidos das proteínas em estudo foi realizada através do alinhamento destas no programa Clustal Omega disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

3.7 Desenho do gene codificador para o antígeno 5 de *Polybia paulista*

A proteína alergênica Antígeno 5 foi identificada com 100% de cobertura da sequência de aminoácidos publicada de antígeno 5 em *Polybia scutellaris* (código UniProtKB AAP57536.1) e então selecionada para a produção recombinante.

Baseado na sequência completa de aminoácidos identificada por espectrometria de massas foi possível desenhar um gene a partir da tradução reversa e a sequência de DNA foi otimizada para produção em *E. coli*.

A tradução reversa foi realizada no programa *Sequence Manipulation Suite - Reverse Translate* disponível em http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html, como segue:

a) Sequencia encontrada para o Ag5 de *Polybia paulista*:

¹NKYCNIKCSKVAHTVCQYGESTKPSSKCNKVSITSVGVTEEEKKLIVDEHNRFRQKVAQGL
ETRGNPGPQPAASDMNNLVWNDELAYIAQVWASQCQFFVHDKCRNTAQYQVGQNIAYSA
STAAYPGIVSLIVLWENEVKDFNYSQGITKENFSKVGHYTQVWVAKTKEVGCGSIKYIEKGM
KSHYLVLCNYGPAGNYMGQPIYTKK²⁰⁶

b) Tradução reversa da sequência do Ag5 e otimização dos códons para expressão em *E. coli*:

¹AACAAATATTGCAACATTAAATGCAGCAAAGTGGCGCATACCGTGTGCCAGTATGGCG
AAAGCACCAAACCGAGCAGCAAATGCAACAAAGTGAGCATTACCAGCGTGGGCGTGAC
CGAAGAAGAAAAAACTGATTGTGGATGAACATAACCGCTTTCGCCAGAAAGTGGCG
CAGGGCCTGGAAACCCGCGGCAACCCGGGCCCGCAGCCGGCGGCGAGCGATATGAA
CAACCTGGTGTGGAACGATGAACTGGCGTATATTGCGCAGGTGTGGGCGAGCCAGTG
CCAGTTTTTTTGTGCATGATAAATGCCGCAACACCGCGCAGTATCAGGTGGGCCAGAAC
ATTGCGTATAGCGCGAGCACCGCGGCGTATCCGGGCATTGTGAGCCTGATTGTGCTGT
GGGAAAACGAAGTGAAAGATTTTAACTATAGCCAGGGCATTACCAAAGAAACTTTAGC
AAAGTGGGCCATTATACCCAGGTGGTGTGGGCGAAAACCAAAGAAGTGGGCTGCGGC
AGCATTAATATATTGAAAAAGGCATGAAAAGCCATTATCTGGTGTGCAACTATGGCCC
GGCGGGCAACTATATGGGCCAGCCGATTTATACCAAAAA⁶¹⁸

A otimização de códons da sequência do Ag5 de *Polybia paulista* para expressão em *E. coli* foi realizada no programa *Codon Usage Database* disponível em <http://www.kazusa.or.jp/codon/> e os códons escolhidos foram os mais frequentemente utilizados pela *E. coli* da cepa BL21, já que a expressão foi realizada em uma cepa derivada de BL21, a Rosetta-gami™ B *Host Strains* (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

A sequência de DNA sintético codificante para o alérgeno rPoly p 5 foi produzida pela empresa Alemã ATG: *biosynthetics GmbH* acoplada ao vetor de expressão pHIS parrallel 2 (Addgene, Cambridge, Reino Unido) com sítios para restrição de enzimas NdeI e Xho.

3.8 Características físico-químicas do alérgeno recombinante

As características físico-químicas teóricas do alérgeno recombinante foram analisadas utilizando-se o programa *Expasy ProtParam* disponível em <http://web.expasy.org/protparam/>.

Após, as características experimentais foram avaliadas por análise de aminoácidos (AAA, do inglês *aminoacid analysis*), dicroísmo circular, espalhamento de luz dinâmica e espectrometria de massas como descrito no item 7.8 dos resultados.

3.9 Modelagem molecular

A modelagem molecular do Ag5 foi realizada no programa *Expasy Swiss model* disponível em <http://swissmodel.expasy.org> com base na estrutura de proteínas similares previamente publicadas.

O modelo molecular do antígeno 5 recombinante de *Polybia paulista* ou rPoly p 5 como nomeado pela IUIS, foi baseado na estrutura de cristalografia do antígeno 5 de *Vespula vulgaris* (Ves v 5) publicada no PDB (do inglês *Protein Data Bank*) com a sigla de acesso 1QNX.

3.10 Produção dos alérgenos recombinantes

3.10.1 Expressão em modelo de *Escherichia coli*

O plasmídeo contendo o gene que codifica para o alérgeno foi transformado em células competentes de *E. coli* da cepa Rosetta-gami™ 2 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) através de eletroporação. As células foram cultivadas a 23°C por 12h em meio LB contendo ampicilina e a expressão foi induzida na fase log de crescimento bacteriano com 0,4M de isopropil-b-D-galactosídeo (IPTG). Após a centrifugação da cultura houve a formação de um botão de células. Este botão de células foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 e as células foram destruídas através de choque térmico e sonicação para que houvesse a formação de um extrato e a solubilização das proteínas de interesse no tampão.

A expressão dos alérgenos recombinantes foi verificada em SDS-PAGE 15% através da comparação com o marcador de peso molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

3.10.2 Purificação do rPoly p 5

O rPoly p 5 foi purificado do extrato bacteriano em duas fases, primeiramente por cromatografia líquida de troca catiônica e posteriormente por filtração em gel de exclusão por tamanho. Na primeira fase foi utilizada uma coluna de troca catiônica HiTrap SP FF (GE

Healthcare, Uppsala, Suécia) e as corridas foram realizadas no equipamento ÄKTA prime (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) com tampão fosfato de sódio 20mM contendo 0,5M de cloreto de sódio, pH 7.0. A segunda fase de purificação para a remoção de possíveis contaminantes se deu em coluna de exclusão por tamanho Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) em tampão bicarbonato de amônio 5 mM. As corridas de exclusão por tamanho foram realizadas em ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e as frações provenientes foram verificadas por SDS-PAGE. Aquelas frações que continham o rPoly p 5 foram misturadas formando uma única amostra que foi liofilizada para armazenamento.

3.10.3 Teste de estabilidade

Para testar a estabilidade do rPoly p 5, quatro alíquotas contendo 20µg do alérgeno recombinante foram incubadas em diferentes temperaturas (20°C, 4°C, -20°C, -80°C) por 96h e uma quinta amostra foi submetida à liofilização. Após, a estabilidade das amostras foi analisada por SDS-PAGE 15%.

3.10.4 Verificação da massa intacta

A massa intacta do rPoly p 5 foi verificada por espectrometria de massas através da deconvolução do espectro de MS utilizando-se o software ProMass Deconvolution™ software (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

3.11 Caracterização físico-química do rPoly p 5

3.11.1 Análise da composição de aminoácidos

A análise da composição de aminoácidos e a concentração de proteínas na amostra foram determinadas utilizando-se o método Pico-Tag™ (Waters, Eschborn, Alemanha) (Himly, 2009, Standardization of allergen products: 1. Detailed characterization of GMP-produced recombinant Bet v 1.0101 as biological reference preparation).

Aproximadamente, 5-10 µg de proteínas foram secas e hidrolisadas em ebulição constante com HCl 6M (Pierce, Rockford, EUA) durante 18h a 124°C sob vácuo. Após neutralização com solução aquosa a 20% v/v de trietilamina e 40 % v/v de etanol, as amostras foram novamente secas e derivatizadas com 10 % v/v de fenilisotiocianato em 70% v/v de etanol e 10 % v/v de trietilamina durante 10 min a temperatura ambiente. As amostras secas foram reconstituídas em Pico-Tag™ Eluente A (Waters, Eschborn, Alemanha), preparado de acordo com as instruções do fabricante e analisadas por HPLC de fase reversa no equipamento UltiMate 3000 (Thermo Fischer, Waltham, EUA) utilizando-se

uma coluna de 3.0x150 mm XSELECT™ HSS T3-3.5 μ m (Waters, Eschborn, Alemanha). Os picos de aminoácidos hidrolisados foram quantificados a 254 nm por comparação com a área do pico do padrão H de aminoácido (Pierce, Rockford, IL, EUA).

3.11.2 Composição da estrutura secundária e estabilidade térmica

A estrutura secundária (% de alfa-hélices e folhas beta) do rPoly p 5 foi determinada por dicroísmo circular (DC). O espectro de DC e a desnaturação térmica foram obtidos em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4 em espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco, Tóquio, Japão). O amplo espectro UV (190–260 nm) foi monitorado e os resultados são apresentados como a elipticidade média molar do resíduo. A estabilidade térmica foi verificada elevando-se a temperatura durante a leitura de 20 até 95°C, 1°C a cada 1 minuto ($\Delta T = 1^\circ\text{C}/\text{min}$) e voltando-se à temperatura inicial para a avaliação da capacidade do alérgeno de reestabelecer a estrutura. Para a determinação do ponto de desnaturação do alérgeno, os espectros foram gravados a 190 nm com base em dados anteriores publicados para Ves v 5.

3.11.3 Capacidade de agregação em solução

A capacidade de agregação em solução do rPoly p 5 purificado foi investigada por D no equipamento DLS 802, Viscotek Corp., Houston, TX, EUA). A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos. Os parâmetros de solvente aquoso foram utilizados. Para o cálculo da intensidade de distribuição das partículas em solução, os dados foram acumulados a cada 10 segundos e a função de correlação ajustada em comparação com os dados de uma curva de referência. Para criar uma curva de referência, 100 amostras padrões com massa molecular conhecida foram analisadas utilizando uma coluna 7.8 por 300 mm TSK2000SWXL (Tosoh Biosciences, Stuttgart, Alemanha) em um sistema de cromatógrafo analítico HP1100 (Hewlett-Packard, San Jose, CA, EUA) com fluxo de 0,5 ml/min em tampão 100 mM de fosfato de sódio pH 6,6, 150 mM de cloreto de sódio, 0.05% NaN₃. Utilizando as medições a 280nm por UV, uma sequência de índices de refração (IR), viscosidade intrínseca (VI) e do ângulo de detecção do espalhamento (TDA 302, Viscotek Corp, Houston, TX, EUA), a massa molecular e o raio hidrodinâmico podem ser determinados. A calibração do detector foi realizada utilizando-se albumina bovina do soro (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich, EUA) a 1.0 mg/ml. Os tamanhos moleculares de raio hidrodinâmico RH (Fischetti, Structure, function, and genetics of streptococcal M protein.) e polidispersão (%RSD) foram analisados e visualizados utilizando o modelo de massas de proteínas do programa OmniSize (Viscotek Corp.).

3.12 Avaliação da reatividade a IgE

A reatividade do rPoly p 5 a IgE foi avaliada por ELISA. Placas Maxisorp (Nalge Nunc, Rochester, EUA) foram recobertas com 50µl de uma solução de PBS contendo 4µg/ml do alérgeno e incubadas o/n a 4°C. Ligações inespecíficas foram bloqueadas com tampão TBS 0,05% (v/v), pH 7.4 Tween-20 e 1% (m/v) BSA por uma hora e incubadas com soro dos pacientes o/n a 4°C. As IgEs específicas foram detectadas com anticorpos monoclonais anti-IgE humana conjugados com fosfatase alcalina (BD Biosciences, Franklin Laker, NJ) e a reação foi revelada com o uso do substrato fosfato de p-nitrofenila (pNPP) que emite luz amarela passível de ser detectada em leitor ótico a 405nm. As medidas foram realizadas sempre em duplicata e foram considerados positivos os valores de densidade ótica que excederem três vezes o background ou a média dos valores do grupo controle mais 3 vezes o desvio padrão.

3.13 Avaliação da reatividade cruzada do antígeno 5 de *Polybia paulista* recombinante com alérgenos homólogos

Para avaliação da reatividade cruzada do rPoly p 5 de *Polybia paulista* com antígenos 5 recombinantes homólogos em outras espécies de vespas foi realizado um ELISA de inibição. Para isto, o soro dos pacientes foi previamente incubado o/n a 4°C com a molécula alergênica homóloga suspeita de apresentar reatividade cruzada e após foi realizado um ELISA convencional para a detecção de IgE, conforme descrito no item 5.9.

Os alérgenos recombinantes homólogos do Poly p 5 em outras espécies de vespas (Ves v 5, Pol a 5, Pol d 5, Vesp c 5, Sol i 3, Dol m 5 e Poly s 5) foram cedidos pelo professor Simon Blank da Universidade técnica de Munique na Alemanha. Estes foram produzidos em sistema de expressão em células de inseto (sf9) e previamente caracterizados.

3.14 Avaliação da capacidade de desgranulação do rPoly p 5

A avaliação da capacidade de induzir a desgranulação e liberação de histamina do rPoly p 5, foi avaliada utilizando uma linhagem celular de leucemia de ratos, são as chamadas RBL 2H3 (do inglês *Rat Basophilic Leukemia cells*) amplamente utilizadas para estudo de alergia. Os basófilos desta linhagem foram isolados e clonados em 1978 no Laboratório de Imunologia do Instituto Nacional de Pesquisa Dental do NIH (do inglês *National institutes of Health*) a partir de células de ratos *Wistar*. Estas células possuem receptores de IgE e podem ser ativadas para secretar histamina e outros mediadores inflamatórios característicos de basófilos como a β -hexosaminidase (Ishizaka, 1980, Stimulation of phospholipid methylation, Ca²⁺ influx, and histamine release by bridging of

IgE receptors on rat mast cells) (Crews, 1980, Phospholipid methylation affects immunoglobulin E-mediated histamine and arachidonic acid release in rat leukemia basophils) (Barsumian, 1981, IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones).

As células foram cultivadas em placa de 96 poços com fundo chato em meio RPMI 1640 e ½ de Meio essencial mínimo (MEM) adicionado de Sais Equilibrados de *Earle*, uma mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Além disso, também foi adicionado 10% de soro fetal bovino.

As células RBL 2H3 foram distribuídas na placa de forma a ter 7×10^5 células/poço em 100µl de meio de cultura. Após, foram cultivadas o/n a 37°C em uma atmosfera com 7% de CO². Foram adicionados 5 µL de soro de cada paciente testado individualmente em uma diluição de 1:10 em tampão de Tyrode (Sigma-Aldrich, EUA). Neste teste foram avaliados soros de 9 pacientes, dos quais havia disponibilidade da quantidade ideal de soro para a realização dos testes.

Para o estímulo com o antígeno, 100µl da solução de rPoly p 5 diluído em tampão Tyrode/BSA (0.1-0.3 µg/ml) foi adicionado a cultura que foi incubada por 60 min 37°C em uma atmosfera com 7% de CO². Para o controle positivo de liberação máxima de histamina pelas células, 10µl de uma solução de 10% de Triton X-100 foi adicionada, a fim de lisar a membrana dos basófilos causando extravasamento do conteúdo citoplasmático. Após a incubação, 50µl do sobrenadante foram removidos e transferidos para uma placa de 96 poços com fundo chato e misturados com uma solução contendo 10% de 4-MUG (do inglês *4-methyl umbelliferyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide*) que serve como substrato para a β-hexosaminidase e forma complexos estáveis com esta enzima, permitindo que ela seja detectada por espectroscopia de fluorescência a 360nm e 465nm para comparação. A porcentagem de β-hexosaminidase detectada é diretamente proporcional à quantidade de histamina liberada.

Como controle positivo do experimento foi utilizado soro de um paciente previamente testado e sabidamente alérgico ao alérgeno Bet v 1 da *Betula verrucosa* e a proteína rBet v 1 como o estímulo.

3.15 Registro no banco de sequências de proteínas

O registro da sequência identificada para o alérgeno rPoly p 5 foi feito na base de dados UniProtKB.

3.16 Reconhecimento do alérgeno pela IUIS

Informações sobre a produção e caracterização do antígeno 5 de *Polybia paulista* foram enviadas para o comitê de nomenclatura de alérgenos da IUIS para o reconhecimento do alérgeno, tendo sido nomeado Poly p 5.

4. Resultados

4.1 Dados demográficos e clínicos dos indivíduos do estudo

A descrição geral dos dados demográficos e clínicos dos indivíduos avaliados neste estudo, sendo 21 pacientes alérgicos e 4 indivíduos controle, encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos da população do estudo

Indivíduos	Sexo	Idade	História clínica	Grau de anafilaxia	Manifestações clínicas	
Pacientes	1	F	34	Vespa - Polybia	3	Urticária, angioedema, sintoma respiratório e gastrointestinal
	2	M	52	Vespa	2	Sintoma gastrointestinal e alteração visual
	3	M	49	Vespa	4	Dispnéia, síncope, liberação esfinteriana, necessitou de intubação orotraqueal
	4	M	59	Vespa	2	Dispnéia, tontura e edema local
	5	M	21	Vespa	2	Urticária, angioedema e sintoma respiratório
	6	M	22	Vespa	4	Edema de membros inferiores, urticária, síncope, angioedema palpebral e de língua
	7	F	29	Vespa	2	Sintomas gastrointestinais, alteração da voz, eritema, angioedema de lábio, vômito e diarreia
	8	M	37	Vespa	4	Tontura, perda de consciência, dispnéia, rouquidão
	9	M	40	Vespa	4	Urticária, angioedema de lábios, dispnéia e desmaio
	10	F	4	Inseto não identificado	1	Urticária e angioedema deformante da face
	11	M	57	Vespa	4	Desmaio
	12	M	16	Inseto não identificado	2	Angioedema labial e palpebral, rouquidão, urticária e prurido ocular
	13	M	40	Vespa	2	Urticária, angioedema e sintoma respiratório
	14	F	32	Vespa	1	Urticária, angioedema e sintoma respiratório
	15	M	17	Vespa	1	Urticária, angioedema e sintoma respiratório
	16	F	9	Vespa	2	Eritema generalizado, angioedema de face e dispnéia
	17	M	12	Inseto não identificado	2	Urticária, angioedema e sintoma respiratório
	18	M	46	Vespa	3	Dispnéia, rash cutâneo, urticária, angioedema de face, barriga, pernas, tontura e perda de visão
	19	M	38	Vespa	2	Dispnéia, angioedema de face, edema no local, cefaléia e febre
	20	F	9	Inseto não identificado	2	Urticária, dispnéia e disfonia
	21	F	25	Inseto não identificado	2	Edema de membros superiores e sintoma respiratório
Controles	22	F	34	Não apresenta	0	Não apresenta
	23	F	30	Não apresenta	0	Não apresenta
	24	M	48	Não apresenta	0	Não apresenta
	25	M	32	Não apresenta	0	Não apresenta

Legenda: F= feminino, M=masculino.

4.2 Avaliação clínica e diagnóstica para análise de sensibilização inseto específica

Os dados da análise diagnóstica realizada através da avaliação da sensibilização IgE específica nos pacientes e controles deste estudo encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Dados de sensibilização IgE específica aos venenos de vespas

Indivíduos		Immunocap	ID e SPT			
			<i>Polybia paulista</i>		<i>Polistes spp.</i>	
			SPT	ID (µg/ml)	SPT	ID (µg/ml)
Pacientes	1	4,16	NEG	0,005	NEG	1,0
	2	1,09	NEG	0,01	NEG	NEG
	3	0,54	NR	NR	NEG	1,0
	4	8,72	NEG	0,1	NEG	0,00
	5	1,93	NR	NR	NEG	0,01
	6	0,93	NEG	NEG	NEG	0,01
	7	<0,35	NR	NR	NEG	0,01
	8	39,8	NR	NR	NEG	1,0
	9	2,70	NR	NR	NEG	0,001
	10	28,00	NR	NR	NR	NR
	11	<0,35	NEG	0,001	NEG	NEG
	12	3,07	NEG	0,005	NEG	0,001
	13	0,77	NR	NR	NR	NR
	14	1,06	NR	NR	NR	NR
	15	5,38	NR	NR	NEG	0,00
	16	5,39	NR	NR	NEG	0,001
	17	8,22	NR	NR	NEG	0,01
	18	33,9	NEG	0,01	NEG	0,001
	19	1,24	NR	NR	NEG	0,01
	20	2,42	NR	NR	NEG	1,00
	21	<0,35	NR	NR	NEG	0,10
Controles	22	<0,35	NR	NR	NR	NR
	23	<0,35	NR	NR	NR	NR
	24	<0,35	NR	NR	NR	NR
	25	<0,35	NR	NR	NR	NR

Legenda: ID= teste intradérmico, SPT= do inglês *skin prick test* = teste cutâneo ou teste de punção na pele, NEG=negativo, NR=não realizado, µg/ml= micrograma por mililitro, kUA /l: do inglês *kilounits of antibody per liter*.

Os indivíduos controles não apresentaram história clínica de alergia a vespa portanto as análises diagnósticas in vivo não foram realizadas. O ImmunoCAP® para *Polistes spp.* foi realizado para excluir qualquer indício de sensibilização.

Os 21 pacientes incluídos no estudo apresentam história clínica de anafilaxia a veneno de himenópteras, com suspeita de alergia a vespa. As manifestações clínicas variam desde urticária, angioedema, sintomas gastrointestinais até desmaio e síncope.

Destes 21 pacientes, 18 (82%) apresentam resultados de ImmunoCAP® positivo para o extrato de veneno de *Polistes spp.*, alguns com títulos altos. O ImmunoCAP® para *Polybia paulista* não está disponível comercialmente,

O teste de puntura na pele com extrato de veneno de *Polistes* spp., foi realizado em 18 pacientes e todos tiveram resultado negativo. Já no teste intradérmico realizado com estes mesmos pacientes, 16 (76%) apresentaram resultado positivo.

Para os 7 pacientes que identificaram o inseto como *Polybia paulista*, ou porque trouxeram o inseto ou porque identificaram por foto, foi realizado o teste intradérmico com o extrato de veneno produzido e 6 apresentaram resultado positivo.

Com base na história clínica, nos dados disponíveis sobre sensibilização IgE-específica e nas possibilidades de testes *in vitro* a serem executados propusemos um organograma da abordagem de diagnóstico e proposta de tratamento para pacientes com anafilaxia após ferroadada de insetos em regiões onde a vespa *Polybia paulista* está presente. A proposta encontra-se na figura 5.

Figura 7 - Abordagem utilizada no presente estudo para diagnóstico e proposta de testes adicionais e tratamento para os pacientes selecionados.

Legenda: As caixas tracejadas indicam dúvidas na conduta, e as caixas pontilhadas representam testes *in vitro* adicionais que poderiam ser realizados. ID=teste intradérmico, ITE= imunoterapia específica, números entre parênteses=identificação do paciente.

4.3 ELISA

Os ensaios de ELISA foram realizados com soro de 17 pacientes dos 21 incluídos neste estudo, de acordo com a disponibilidade de amostra de soro.

A mediana de magnitude de reatividade IgE específica dos pacientes alérgicos foi maior para o veneno de *Polybia paulista* quando comparada a reatividade ao veneno de *Polistes* spp. (Figura 6) com significância estatística ($p=0,0076$).

Figura 8 - Reatividade de IgE aos extratos de venenos de *Polybia paulista* e *Polistes* spp.

Legenda: DO=densidade óptica.

Quando a reatividade de IgE específica de cada paciente frente aos dois venenos em estudo é comparada, também é possível observar que a reatividade ao veneno de *Polybia* foi maior. Além disso, nota-se que as IgEs específicas de cada paciente reconhecem tanto alérgenos no veneno de *Polybia paulista* quanto no veneno de *Polistes* spp. (Figura 8). Ao compararmos os resultados de ImmunoCAP e ELISA, ambos *in vitro* com extrato de *Polistes* nota-se que os resultados nem sempre são convergentes como mostra a figura 9.

Figura 9 - Reatividade de IgE de cada paciente aos extratos de venenos de *Polybia* paulista e *Polistes* spp.

Legenda: DO=densidade óptica.

4.1 Western blotting 1D e identificação de novos alérgenos

Experimentos de *Western blotting* 1D foram realizados com pool dos soros dos pacientes incluídos neste estudo (Figura 11).

Figura 10 - Western blotting 1D e identificação de novos alérgenos

MW: Marcador de peso molecular; Pb: veneno de *Polybia paulista*; Pt: veneno de *Polistes* spp.

Dentre as proteínas identificadas, Ag5, PLA1 e Arginina quinase foram selecionadas para a clonagem dos genes. Além disso, também foram identificadas GAPDH e frutose-bisfosfato-aldolase, mas decidiu-se não prosseguir com elas por tratar-se de proteínas endógenas, e por isso pouco provavelmente seriam alérgenos.

4.2 Western blotting 1D

Ensaio de *Western blotting* 1D foram realizados com soro de 9 pacientes dos 21 incluídos neste estudo (Figura 9), os quais havia maior disponibilidade de amostra.

Figura 11 - Western blotting 1D

MW: Marcador de peso molecular; Pb: veneno de *Polybia paulista*; Pt: veneno de *Polistes* spp.

Os 9 pacientes testados apresentaram reação de IgE positiva contra alérgenos dos dois venenos em estudo (*Polybia paulista* e *Polistes* spp.) não havendo um mesmo padrão de reconhecimento das bandas entre os dois venenos. Muitas bandas reconhecidas no veneno de *Polybia paulista* tem peso molecular de proteínas que ainda não foram identificadas como alérgenos em venenos de insetos e poderiam ser novos alérgenos.

4.3 Abordagem *highthroughput* de espectrometria de massas do veneno total de *Polybia paulista*

Um novo lote de veneno foi extraído para a ida a Salzburg e foi realizado uma abordagem do tipo *highthroughput* para identificar o máximo possível das proteínas presentes no veneno total. Isto permitiu a confirmação da presença das proteínas identificadas como alergênicas no lote anterior. Um total de 2340 proteínas foram identificadas no extrato do veneno de *Polybia paulista*, muitas delas ainda não descritas para este veneno, tais como fator de alongamento 1 alfa, ubiquitina, citocromo c e enolase. Os alérgenos Fosfolipase A1 (PLA1) e o Antígeno 5 (Monsalve, , Expression of yellow jacket and wasp venom Ag5 allergens in bacteria and in yeast) (Tabela 3), foram identificadas com 100% de cobertura das sequências de aminoácidos. Várias tentativas de clonagem destes 2 genes foram realizadas, entretanto obtivemos sucesso somente com Ag5. Seguimos então com a produção da molécula de Antígeno 5 recombinante.

Apesar de o antígeno 5 já ter sido identificado e descrito como alérgeno do veneno de *Polybia paulista*, pouco foi investigado com relação a molécula. A sequência que foi encontrada no presente trabalho apresenta algumas diferenças quando comparada com a sequência publicada por dos Santos et al em 2010 (UniProtKB/Swiss-Prot: P86686.1) sugerindo que esta seja uma isoforma e difere apenas em dois resíduos de uma sequência do Ag5 de *Polybia scutellaris* (UniProtKB/Swiss-Prot: Q7Z156.2), descrita como hipoalergênica (Figura 8).

A sequência de antígeno 5 encontrada no extrato de veneno de *Polybia paulista* tem 100% de identidade com a sequência publicada de antígeno 5 em *Polybia scutellaris* código UniProtKB AAP57536.1 (Tabela 3, figura 7 e 8), que não foi descrita, entretanto, como hipoalergênica.

Figura 12- Cobertura da sequência de proteína madura do antígeno 5 de *Polybia paulista*. Baseada na sequência do antígeno 5 de *Polybia scutellaris* identificada.

P86686.1	NKYCN IRC SKVAHTVCQTGES TKP SS KNC AKVSI TSVGVTEE EK KLI VDE HNRFR QKVAQ
Q7Z156.2	NKYCN IRC SKVAHTVCQTGES TKP SS KNC NKVSI TSVGVTEE EK KLI VDE HNRFR QKVAQ
rPoly	NKYCN IRC SKVAHTVCQTGES TKP SS -KCNKVSITSVGVTEE EK KLI VDE HNRFR QKVAQ
*****_*_******	
P86686.1	GLETRGNPGPQPAASDMNVLWNDELAYIAQVWA SQQ QF FVHDKCRNTAQYQVGQNIAYS
Q7Z156.2	GLETRGNPGPQPAASDMNVLWNDELAYIAQVWA SQQ QF FVHDKCRNTAQYQVGQNIAYS
rPoly	GLETRGNPGPQPAASDMNVLWNDELAYIAQVWA SQQ QF FVHDKCRNTAQYQVGQNIAYS
*****_*_******	
P86686.1	ASTAAYPGVVKLI VLWENEVKDFNYNTGSI TRENFAKVGHY TQVWNATKE VGC GS IKYIE
Q7Z156.2	ASTAAYPGIVSLI VLWENEVKDFNYSGI TRENFAKVGHY TQVWNATKE VGC GS IKYIE
rPoly	ASTAAYPGIVSLI VLWENEVKDFNYSGI TRENFAKVGHY TQVWNATKE VGC GS IKYIE
*****_*_******	
P86686.1	HGMKSHYLVCMYGPAGNVLGAQIYEIK
Q7Z156.2	HGMKSHYLVCMYGPAGNYMGQPIYTKK
rPoly	HGMKSHYLVCMYGPAGNYMGQPIYTKK
*****_*_*_*_*	

Figura 13 - Similaridade entre as sequencias.

Comparação entre as sequencias de aminoácidos do antígeno 5 de *Polybia scutellaris* (Q7Z156.2), antígeno 5 de *Polybia paulista* anteriormente descrito (P86686.1) e antígeno 5 de *Polybia paulista* descrito neste trabalho (rPoly p 5).

O espectro anotado do melhor peptídeo único suporta a qualidade do sequenciamento desta proteína (Figura 13).

4.4 Modelagem molecular

O modelo molecular do rPoly p 5 apresenta estrutura 60.89% idêntica à estrutura molecular do alérgeno Ves v 5 de *Vespula vulgaris* (Figura 10), que apresenta 58.71% de identidade a nível de sequência de aminoácidos (UniProtKB Q05110) (Figura 11).

Figura 15 - Modelo molecular do rPoly p 5 de *Polybia paulista*. Em vermelho encontram-se destacadas as regiões distintas da estrutura usada como molde, Ves v5.

rPoly	NKYCNKCSKV-AHTVCQYGESTKPSKCNKVSITSVGVTEEEKKLIVDEHNRFRQKVAQ
lQNX:Vesv5	-NYCIKCLKGGVHTACKYGLK---PNCGNKVVS YGLTKQEKQDILKEHNDFRQKIAR
	:*:*** * .**.*:*. . :* : :.* *:***:*. *:*** ***:**:
rPoly	GLETRGNPGPQPAASDMNNLVWNDELAYIAQVWASQCQFFVHDKCRNTAQYQVGQNIAYS
lQNX:Vesv5	GLETRGNPGPQPPAKNMKNLVWNDELAYVAQVWANQCQY-GHDTCDVAKYQVGQNVALT
	***** *.:*:*****:*****.***: **.***.:*:*****:* :
rPoly	AST-AAYPGIVSLIVLWENEVKDFNYSQGITKENFSKVGHYTQVWAKTKEVGCGSIKYI
lQNX:Vesv5	GSTAAYKDDPVKLVKMWEDEVKDYNPKKKFSGNDFLKTGHYTQMVWANTKEVGCGSIKYI
	.** * * .*: :*:***:* .: : :.* *.***:***:*****
rPoly	EKGMKSHYLCNYGPAGNYMGQPIYTKK
lQNX:Vesv5	QEKWHKHLYLCNYGPSGNFKNEELYQTK
	: : .*****:***: : :* .*

Figura 16 - Alinhamento entre as sequencias de aminoácidos do rPoly p 5 e Ves v5.

4.5 Produção do rPoly p 5

4.5.1 Expressão do rPoly p 5

O alérgeno recombinante Poly p 5 foi expresso com o peso molecular esperado (aproximadamente 25 kDa) sendo a maior parte deste expressa na fração solúvel (Figura 12).

Figura 17 - Expressão do alérgeno rPoly p 5 verificada por SDS-PAGE.

4.5.2 Purificação do rPoly p 5

O alérgeno recombinante rPoly p 5 foi purificado do extrato bacteriano com alta eficiência na primeira fase de purificação e as frações recuperadas do processo apresentavam altas concentrações do alérgeno como verificado na Figura 13.

Figura 18 - Pureza das frações após a primeira fase de purificação.

Na segunda fase de purificação houve a remoção de todas as impurezas e o alérgeno foi totalmente purificado do extrato bacteriano (Figura 14).

Figura 19 - Avaliação da pureza do rPoly p 5 após etapa final de purificação.

4.5.3 Teste de estabilidade do rPoly p 5

O alérgeno rPoly p 5 mostrou-se estável em diversas temperaturas por até 96h (Figura 15).

Figura 20 - Análise da estabilidade do alérgeno rPoly p 5

4.5.4 Avaliação da massa intacta do rPoly p 5

A massa monoisotópica do alérgeno rPoly p 5 corresponde a 23200.41 Da e a massa verificada é de 23192.41 Da. A diferença de massa corresponde a 8 hidrogênios perdidos durante a formação das 4 pontes dissulfeto (Figura 16).

[Theoretical pI: 8.90 / Mw (average mass): 23215.36 / Mw (monoisotopic mass): 23200.41]				peptide sequence
mass	position	#MC	modifications	
23201.4139	1-207	0		MNKYCNKCSKVAHTVCQYG ESTKPSSKCNKVSITSVGVT EEEKKLIVDEHNRFRQKVAQ GLETRGNPGPQPAASDMNNL VWDELAYIAQVWASQCQFF VHDKCRNTAQYVGGQNIAYS ASTAAYPGIVSLIVLWENEV KDFNYSQGITKENFSKVGHY TQVWAKTKEVGCSSIKYIE KGMKSHYLCNYGPAGNYMG QPIYTKK
100.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):				
<div> <div>102030405060</div> <div>MNKYCNKCSKVAHTVCQYG ESTKPSSKCNKVSITSVGVT EEEKKLIVDEHNRFRQKVAQ</div> </div> <div> <div>708090100110120</div> <div>GLETRGNPGP QPAASDMNNL VWDELAYIA QVWASQCQFF VHDKCRNTAQ YVGGQNIAYS</div> </div> <div> <div>130140150160170180</div> <div>ASTAAYPGIV SLIVLWENEV KDFNYSQGIT KENFSKVGHY TQVWAKTKE VGCSSIKYIE</div> </div> <div> <div>190200</div> <div>KGMKSHYLC NYGPAGNYMG QPIYTKK</div> </div>				

Figura 21 - Determinação da massa intacta do alérgeno rPoly p 5.

4.6 Caracterização físico-química do rPoly p 5

As propriedades físico químicas teóricas do alérgeno rPoly p 5 foram confirmadas através de ensaios experimentais.

4.6.1 Análise da composição de aminoácidos

A porcentagem teórica de cada aminoácido que compõe o rPoly p 5 (representada em vermelho) foi confirmada no ensaio experimental (representada em verde) o que confirma que o alérgeno recombinante produzido é o Poly p 5 (Figura 17).

Figura 22 - Comparação entre a composição de aminoácidos analisada teórica (vermelho) e experimentalmente (verde).

4.6.2 Composição da estrutura secundária e estabilidade térmica

O espectro do dicroísmo circular mostra que a proteína possui a conformação esperada quando comparada aos homólogos de antígeno 5 em outras espécies, por exemplo Ves v 5, sendo uma mistura de hélices alfa e folhas beta.

Quando aquecido a 95° C rPoly p 5 perde a sua conformação e não é passível de voltar a conformação inicial quando a temperatura ambiente é reestabelecida (Figura 18).

Figura 23 - Composição da estrutura secundária do rPoly p 5

4.6.3 Teste de agregação em solução por DLS

A amostra apresenta um padrão de distribuição molecular homogêneo em solução, sendo a forma monomérica com 2.19 nm de tamanho a mais abundante (Figura 19).

Figura 24 - População de moléculas monoméricas

4.7 Avaliação da reatividade a IgE

A reatividade de IgE ao alérgeno recombinante Poly p 5 foi avaliada individualmente com soro de todos os pacientes do estudo. Dentre os 22 pacientes alérgicos a vespas, 11 (50%) possuem IgEs capazes de reconhecer o rPoly p 5 no ELISA (Figura 20).

Figura 20. Reatividade de IgE ao rPoly p 5. A linha pontilhada indica cut off, calculado pela média dos controles mais três vezes o desvio padrão.

4.8 Avaliação da reatividade cruzada do antígeno 5 de *Polybia paulista* recombinante com alérgenos homólogos

Poly s 5, que tem a sequência de proteína mais semelhante quando comparado com o Poly p 5, foi capaz de inibir cerca de 70 % da reatividade de IgE como esperado (Figura 21).

Para os outros homólogos, a porcentagem de inibição foi menor, mas presente, o que mostra que existem epítomos comuns entre esses homólogos que podem gerar IgEs capazes de reagir de forma cruzada desencadeando a resposta alérgica. Devido a esta reatividade, a porcentagem de IgEs que não foram inibidas com Poly p 5 são IgEs dirigidas a epítomos únicos do rPoly p 5 de *Polybia paulista* mostrando que este alérgeno recombinante é uma valiosa ferramenta de diagnóstico para alergia ao veneno de *Polybia paulista*.

Figura 25 -. Reatividade cruzada de IgE com homólogos de Poly p 5 em outras espécies de vespas.

Ao analisar o perfil de inibição de cada paciente, nota-se que é um perfil variável e que cada paciente possui IgEs passíveis de inibição por outros alérgenos homólogos do Poly p 5 em porcentagens diferentes (Figura 22).

Figura 26 - Reatividade cruzada de IgE com homólogos de Poly p 5 em outras espécies de vespas analisado por paciente.

4.9 Teste de desgranulação de basófilos em linhagem celular

O teste funcional para avaliação do potencial alergênico do alérgeno Poly p 5 foi realizado através da mensuração da liberação de histamina por basófilos de rato frente o estímulo específico em cultura. Os resultados mostraram que a liberação de histamina causada por Poly p 5 foi extremamente baixa (máximo 4%) quando comparado ao controle positivo Bet v 1 (45 a 60%) (Figura 23).

Figura 27 - Capacidade alergênica do rPoly p 5

4.10 Registro no banco de sequências de proteínas

O registro da sequência identificada para o alérgeno rPoly p 5 na base de dados UniProtKB recebeu a sigla de identificação C0HJV9 e estará disponível no momento da publicação do artigo, fruto deste trabalho.

4.11 Registro na base de dados de alérgenos da IUIS

O alérgeno Poly p 5 foi reconhecido pelo comitê de nomenclatura de alérgenos da IUIS e o registro está disponível em <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=853>. A sequência de aminoácidos do alérgeno Poly p 5 será divulgada no momento da publicação do artigo, fruto deste trabalho.

5. Discussão

Este trabalho teve início quando médicos do Serviço de Alergia do Hospital das Clínicas se depararam com pacientes com história clínica convincente de ferroadada por vespa, cujo teste cutâneo com o extrato disponível para diagnóstico é negativo. Diante disso, o médico alergista fica impossibilitado de iniciar um tratamento específico e o paciente continua sob risco diante de uma nova exposição.

Alguns pacientes trazem o inseto agressor para que o médico o identifique e por muitas vezes é verificado que não se trata de *Polistes* spp., uma vespa comumente encontrada no hemisfério norte.

Temos mais de 500 espécies de vespas no Brasil, que potencialmente podem provocar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Entretanto, o único extrato disponível para diagnóstico e tratamento dos pacientes brasileiros alérgicos a vespas é uma mistura de venenos de vespas do gênero *Polistes* spp., que provocam acidentes tanto no hemisfério norte como no Brasil.

Os principais alérgenos presentes nos venenos de *Polistes* spp., bem como de *Vespula* spp ou *Dolichovespula* spp já foram identificados e estudados, entretanto há poucos estudos envolvendo a identificação de alérgenos presentes nos venenos de vespas que ocorrem em países tropicais como o Brasil.

A *Polybia paulista* é uma vespa social agressiva encontrada no Cone Sul, principalmente no Brasil, que frequentemente causa acidentes alérgicos com consequências graves. Apesar de sua importância médica, ainda não existem extratos e nem alérgenos recombinantes para diagnóstico e tratamento dos pacientes alérgicos.

Todos os que não tem o exame ID para *Polybia* mas tem exame realizado e positivo para *Polistes* apresentam um perfil no WB que se assemelha mais ao das pessoas que tem ID positivo para *Polybia*, sugerindo a necessidade de realização de teste ID para *Polybia*;

Jorge Bispo 21: O paciente apresenta historia clinica de reação com vespa, abelha e formiga. Teste ID positivo para os três e ID para *Polybia* não realizado. Apresenta Immunocap positivo para os três venenos e CCD negativo. WB mostra reconhecimento de bandas exclusivas em cada veneno (*Polybia* e *Polistes*) sugerindo perfil de sensibilização genuína que requereria ITE para ambos os venenos. Seria interessante que ele fizesse o ID para *Polybia* para confirmar a suspeita e indicação de ITE, já que no ELISA também apresenta resultado bastante elevado.

Os testes diagnósticos tradicionais, tanto de pele quanto *in vitro*, são realizados com extratos alergênicos produzidos a partir da fonte natural, porém existem algumas desvantagens como a presença de CCDs, que podem resultar em falso positivos

atrapalhando o diagnóstico e consequentemente o tratamento. Os resultados *in vitro* com extrato total de veneno mostraram que não há convergência entre os resultados do ELISA e o ImmunoCAP, o que nos remete a uma longa discussão sobre a padronização dos extratos alérgicos.

Desta forma, existe o interesse em produzir alérgenos recombinantes, em sistemas de expressão heterólogos, os quais não possuem CCDs. A partir daí muitas técnicas de produção de alérgenos recombinantes foram produzidas. Dentre elas, o sistema de expressão em levedura ou células de insetos, já que quando o alérgeno era produzido em sistema bacteriano a sua conformação não acontecia corretamente e os epítomos de IgEs não ficavam expostos como no alérgeno natural, acarretando diminuição de reatividade de IgE, não sendo vantajoso o uso da recombinante com relação ao uso da proteína natural. Depois de muitas tentativas, alguns alérgenos recombinantes de himenópteras foram produzidos e esta área da pesquisa vem se desenvolvendo ativamente a cada dia (Ollert, 2015, Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics).

Alguns destes alérgenos já estão disponíveis no sistema ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) que é o teste diagnóstico utilizado na rotina clínica. No Brasil, estes componentes não estão disponíveis para teste através do SUS, portanto a dificuldade de diagnóstico dos pacientes alérgicos a vespas é muito grande.

O veneno dos insetos da ordem Hymenoptera é composto por uma mistura de componentes biologicamente ativos, comuns em diferentes espécies desta ordem que podem apresentar reatividade cruzada (Ollert, 2015, Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics) como é o caso da fosfolipase. A homologia entre a sequência de aminoácidos da fosfolipase em diferentes espécies de himenópteras é em média de 70%, ou seja, alguns epítomos podem ser considerados únicos a cada espécie. Através da utilização de alérgenos recombinantes característicos de cada espécie, chamado de diagnóstico por componentes, é possível que o diagnóstico diferencial seja realizado, levando a identificação do inseto agressor que causou a sensibilização primária e consequentemente possibilitando que o paciente alérgico seja tratado corretamente.

Sendo assim, o conhecimento detalhado da composição dos venenos das vespas brasileiras, é imperativo para o desenvolvimento de diagnósticos com abordagens moleculares e estratégias terapêuticas aplicáveis nos pacientes alérgicos a vespas do Brasil.

A partir do estudo do proteoma do veneno da *Polybia paulista*, algumas proteínas foram identificadas como alérgicas (dos Santos, 2010, Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism.). Dentre elas, a fosfolipase e o antígeno 5 chamaram a atenção já que são descritas como alérgenos importantes em outras espécies de himenópteras. Outras

proteínas como a arginina quinase e a frutose-bisfosfato-aldolase, ainda não haviam sido descritas como alérgenos em himenópteras.

No presente trabalho, a análise proteômica revelou a presença de fosfolipase e antígeno 5 como anteriormente descrito. A fosfolipase encontrada possui a mesma sequência da forma encontrada no estudo realizado em 2010. Já o antígeno 5 apresentou uma sequência que difere da sequência anteriormente encontrada em dois resíduos de aminoácidos, mas apresenta 100% de identidade com a sequência de aminoácidos do antígeno 5 de *Polybia scutellaris*, que é uma variante naturalmente hipoalergênica. Este alérgeno de *Polybia paulista* torna-se então uma molécula particularmente interessante pois Vinzon e colaboradores (Vinzón, 2012, A naturally occurring hypoallergenic variant of vespid Antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom as a candidate for allergen-specific immunotherapy) mostraram que uma das isoformas do Antígeno 5 de *Polybia scutellaris*, Poly s 5, é uma molécula hipoalergênica, capaz de induzir imunogenicidade em camundongos, verificada através da produção de IgG com reatividade cruzada com Pol a 5, Antígeno 5 de outra vespa, conhecidamente alérgeno. Ao mesmo tempo em que Poly s 5 induz quantidades mínimas de IgE e induz pouca liberação de mediadores de basófilos em modelo animal.

O alinhamento de sequência de aminoácidos entre a molécula hipoalergênica e a proteína identificada para *Polybia paulista* mostra que existe a substituição de apenas 2 resíduos de aminoácidos, reforçando a possibilidade de tratar-se também de molécula hipoalergênica. Este tipo de molécula é particularmente importante para o uso em Imunoterapia alérgeno específica e, portanto, o antígeno 5 foi o alérgeno de escolha para ser produzido neste trabalho como proteína recombinante.

A clonagem do gene que codifica para o antígeno 5 de *Polybia paulista* (rPoly p 5) não foi possível de ser realizada por motivos técnicos e por isso partimos para a abordagem de identificação da sequência de aminoácidos para a construção do gene que codifica para esta proteína.

O rPoly p 5 foi expresso em *E. coli*, purificado e as características físico-químicas foram avaliadas.

Um modelo de estrutura do alérgeno rPoly p 5 foi construído *in silico*. A estrutura apresenta identidade de aproximadamente 61% com o Ves v 5.

Nas análises de espectrometria de massa, o rPoly p 5 apresentou a massa intacta correta e as quatro pontes dissulfeto formadas, mostrando que o alérgeno possuía a conformação correta.

Através de análises de dicroísmo circular foi possível observar que o rPoly p 5 apresenta a estrutura composta por uma mistura de folhas beta e alfa-hélices, como descrito para o seu homólogo em *Vespa vulgaris*, o Ves v 5 (Henriksen, 2001, Major

venom allergen of yellow jackets`, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily). O rPoly p 5 quando aquecido a 95° C, perde a sua conformação e não é passível de voltar a conformação inicial quando a temperatura ambiente é reestabelecida.

O alérgeno rPoly p 5 foi avaliado quanto as suas características imunológicas, ou seja, verificação da reatividade de IgE, avaliação da reatividade cruzada com outros alérgenos homólogos em outras espécies e teste de desgranulação de basófilos *in vitro*.

Dos 17 pacientes alérgicos a *Polybia paulista* incluídos neste estudo e testados para rPoly p 5, 10 possuíam IgEs que reconheceram a molécula representando 59% da população em estudo, o que caracteriza o Poly p 5 como um alérgeno maior, já que foi reconhecido por mais de 50% dos indivíduos testados e apresenta grande relevância clínica.

Através de ELISA de inibição com alérgenos recombinantes homólogos do Poly p 5, a porcentagem de reatividade cruzada entre estes foi avaliada. O rPoly p 5 se mostrou reativo cruzadamente com todos os homólogos testados, sendo que a porcentagem maior de reatividade cruzada foi observada com o Poly s 5, o hipoalérgeno de *Polybia scutellaris*, e a menor reatividade se deu com Sol i 3, de formiga. A porcentagem de reatividade cruzada entre os homólogos foi em torno de 60% o que indica que cada antígeno 5 possui epítomos únicos (não são passíveis de serem inibidos por IgEs geradas contra homólogos), mas também epítomos comuns, passíveis de serem inibidos. A relevância clínica deste dado se dá já que um paciente pode gerar IgEs contra epítomos únicos ou comuns entre estes homólogos de antígeno 5, o que gera um perfil único de sensibilização. Se o paciente for sensibilizado com epítomos comuns entre os homólogos, o risco de desenvolver uma reação com outros insetos, que não o sensibilizador primário, é grande. Isso pode ser observado para o paciente 17 que, como mostrado na figura 21 cujos homólogos são praticamente todos inibidos 100% pelo Poly p 5, indicando que o paciente deve ser sensibilizado apenas a epítomos comuns, possivelmente desenvolvendo uma reação alérgica mesmo para venenos de vespas com as quais nunca teve contato.

Para que um alérgeno seja assim considerado, este deve, além de ser capaz de ser reconhecido por IgEs específicas também ativar as vias de desgranulação em mastócitos e basófilos. O rPoly p 5 é uma molécula passível de reconhecimento por IgEs, porém não foi capaz de gerar a desgranulação de basófilos em células de ratos quando comparado ao alérgeno utilizado como controle positivo do experimento, o Bet v 1. Este resultado reforça a possibilidade de esta ser uma forma hipoalergênica de antígeno 5, mas testes com basófilos de pacientes alérgicos são necessários para a confirmação deste resultado.

A sequência do rPoly p 5 foi depositada no banco de dados de proteínas do NCBI e este alérgeno foi reconhecido pelo comitê de nomenclatura de alérgenos da IUIS.

Destaca-se que além dos alérgenos já descritos, foi possível observar através do Western Blotting que ainda existem alérgenos não identificados no veneno de *Polybia paulista*.

No futuro, os novos alérgenos poderão ser incluídos nos testes diagnósticos e pode ser que a melhor escolha seja o uso de extratos que consistam da combinação de alérgenos naturais e recombinantes, aumentando as chances de diagnosticar e tratar os pacientes de uma forma direcionada, só com os alérgenos cuja a sensibilização existe.

A alergologia molecular é uma área de pesquisa que vem se desenvolvendo em todo o mundo e poucos são os grupos de pesquisa em nosso país atuando nessa área. A caracterização imunológica e estrutural de moléculas alergênicas, além de auxiliar no diagnóstico e tratamento de alergias não descritas oferece ferramentas para a predição de epítomos e produção de moléculas hipoalergênicas no futuro.

6. Conclusão

O veneno de *Polybia paulista* mostrou-se imprescindível para o correto diagnóstico e futuro tratamento dos pacientes com história de alergia a vespa em nossa região.

Devido a extensa reatividade cruzada o antígeno 5 não é um marcador apropriado para o diagnóstico preciso, entretanto, a reatividade IgE-específica a esta molécula combinada com outros alérgenos de *Polybia* podem vir a ser uma ótima ferramenta para o correto diagnóstico e tratamento de pacientes com alergia a venenos de vespas.

Pela primeira vez a utilização de um sistema de expressão em *E. coli* para a produção de antígeno 5 recombinante resultou em um alérgeno com a estrutura correta e estável, o que faz do rPoly p 5 uma ferramenta importante para diagnóstico e tratamento da alergia a veneno de *Polybia paulista*.

A molécula produzida é potencialmente hipoalergênica e testes *in vitro* com sangue de pacientes alérgicos poderão confirmar ou não essa suspeita, tornando a molécula uma ferramenta poderosa a ser utilizada na imunoterapia.

7. Referências

1. Fuchs O, Bahmer T, Rabe KF, von Mutius E. Asthma transition from childhood into adulthood. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2017. p. 224–34.
2. Werfel T, Allam JP, Biedermann T, Eyerich K, Gilles S, Guttman-Yassky E, et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016. p. 336–49.
3. Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD, Galli SJ, Nadeau KC. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016. p. 984–97.
4. Akdis C a, Akdis M. Advances in allergen immunotherapy: Aiming for complete tolerance to allergens. *Sci Transl Med [Internet]*. 2015;7(280):280ps6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810310>
5. Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun [Internet]*. 2014;15(8):511–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25056447>
6. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J [Internet]*. 2015 Dec 14 [cited 2017 May 28];8(1):17. Available from: <http://www.waojournal.org/content/8/1/17>
7. Palomares O, Akdis M, Martín-Fontecha M, Akdis CA. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunological Reviews*. 2017. p. 219–36.
8. Palomares O, Rückert B, Jartti T, Küçüksezer UC, Puhakka T, Gomez E, et al. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3 + Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2).
9. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016. p. 654–65.
10. Van De Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1204–12.
11. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Ruckert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med [Internet]*.

- 2008;205(12):2887–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001136>
12. Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: A population-based cross-sectional study. *Lancet*. 2001;357(9258):752–6.
 13. Küçüksezer UC, Palomares O, Rückert B, Jartti T, Puhakka T, Nandy A, et al. Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3).
 14. Jartti T, Palomares O, Waris M, Tastan O, Nieminen R, Puhakka T, et al. Distinct regulation of tonsillar immune response in virus infection. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2014;69(5):658–67.
 15. Moingeon P. Adjuvants for allergy vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2012. p. 1492–8.
 16. Moingeon P. Update on Immune Mechanisms Associated with Sublingual Immunotherapy: Practical Implications for the Clinician. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(3):228–41.
 17. von Moos S, Johansen P, Tay F, Graf N, Kündig TM, Senti G. Comparing safety of abrasion and tape-stripping as skin preparation in allergen-specific epicutaneous immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 Oct [cited 2017 Jul 25];134(4):965–967.e4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674914010410>
 18. Kündig TM, Johansen P, Bachmann MF, Cardell LO, Senti G. Intralymphatic immunotherapy: time interval between injections is essential. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2017 Jul 25];133(3):930–1. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674913018617>
 19. Golden DBK, Demain J, Freeman T, Graft D, Tankersley M, Tracy J, et al. Stinging insect hypersensitivity: A practice parameter update 2016. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2017;118(1):28–54.
 20. Simons FER, Arduzzo LR, Bilò MB, Cardona V, Ebisawa M, El-Gamal YM, et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organ J* [Internet]. 2014;7(1):9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4038846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Chttp://www.waojournal.org/content/7/1/9>

21. dos Santos LD, Santos KS, Pinto JRA, Dias NB, Souza BM de, dos Santos MF, et al. Profiling the Proteome of the Venom from the Social Wasp *Polybia paulista*: A Clue to Understand the Envenoming Mechanism. J Proteome Res [Internet]. 2010 Aug 6 [cited 2017 May 28];9(8):3867–77. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr1000829>