

Avaliação dos níveis de Imunoglobulina E específicas para os alérgenos recombinantes Poly p 1 e Poly p 5 do veneno da vespa *Polybia paulista* no soro de pacientes alérgicos à picada de vespa: potencial uso para o acompanhamento do protocolo de imunoterapia

Palavras-Chave: Alergia ao veneno de himenópteros, imunoterapia, *Polybia paulista*, alérgenos recombinantes

Autores(as):

Juliana de Assis Chagas, Curso de Medicina – PUCCAMP

Laís Stephanie Minati, Curso de Biomedicina - PUCCAMP

Prof. Dr. Luis Gustavo Romani Fernandes (orientador), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A alergia ao veneno de himenópteros (AVH) é uma causa comum de anafilaxia no Brasil e no mundo, sendo essencial o diagnóstico correto e a identificação do inseto para um tratamento eficaz (Palma M.S., 2013). A imunoterapia com veneno (VIT) é o único tratamento capaz de prevenir futuras reações sistêmicas (Sturm et. al. 2018). No Brasil, a vespa *Polybia paulista* tem alta relevância clínica devido ao seu comportamento agressivo e presença crescente em áreas urbanas (Perez-Riverol, et. al., 2016).

O diagnóstico e o acompanhamento da VIT dependem da detecção da imunoglobulina E específica (IgE) para os alérgenos do veneno (Ansotegui et al., 2020). Atualmente, utilizam-se extratos brutos ou alérgenos de vespas de outras regiões, o que pode comprometer a precisão dos testes (Blank et al., 2018). Estudos anteriores identificaram três principais alérgenos do veneno de *P. paulista* (Poly p 1, Poly p 2 e Poly p 5), levando ao desenvolvimento de versões recombinantes por nosso grupo de pesquisa (Perez-Riverol et. al. 2015), visando aplicação futura em imunodiagnóstico e imunoterapia.

Este trabalho visa avaliar o potencial uso dos alérgenos recombinantes rPoly p 1 e rPoly p 5 derivados do veneno da vespa *P. paulista* no desenvolvimento de ensaios de ELISA para o monitoramento dos níveis de IgE em pacientes submetidos à protocolo de VIT, com o intuito de desenvolver testes com maior acurácia para o cenário brasileiro ao utilizar alérgenos oriundos de espécies nativas.

METODOLOGIA:

Soros de pacientes alérgicos ao veneno de vespa (n=11), previamente submetidos a protocolo de imunoterapia com veneno (VIT), foram obtidos do biobanco do Laboratório de Imunologia Translacional. O diagnóstico dos pacientes baseou-se na história clínica, testes de puntura cutânea (*skin prick test*) e níveis de IgE específica (sIgE) para o alérgeno i3 (veneno de vespa comum >0,3 kU/L), medidos pelo teste ImmunoCAP (Van Hage et al., 2017). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética para a utilização destas amostras (protocolo 80822817.3.0000.5404).

Amostras de soro dos pacientes foram utilizadas para detectar sIgE contra alérgenos do veneno bruto de *Polybia paulista* e contra as proteínas recombinantes Poly p 1 e Poly p 5, em ensaios de imunoblote e ELISA indireto. Os alérgenos do veneno bruto foram obtidos a partir das glândulas de veneno e semipurificados por ultrafiltração com membranas de 3 kDa. Os alérgenos recombinantes Poly p 1 e Poly p 5 foram produzidas por expressão heteróloga em *E.coli* e na levedura *Pichia pastoris*, respectivamente. Os dados obtidos nos ensaios de ELISA indireto foram analisados utilizando os testes de Wilcoxon, correlação de Spearman e Bland-Altman ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1.1 Avaliação da integridade e imunoreatividade dos alérgenos

Para a avaliação da integridade e a imunoreatividade dos alérgenos presentes no extrato semipurificado do veneno de *P. paulista* e dos recombinantes rPoly p 1 e rPoly p 5 foram realizados ensaios de Western blot com soro de pacientes alérgicos sendo os resultados destes ensaios apresentados na figura 1, conforme protocolo previamente descrito (Abram et al., 2020).

As bandas correspondentes aos pesos moleculares esperados (35 kDa para Poly p 1 e 25 kDa para Poly p 5) foram identificadas. No caso da rPoly p 5, observou-se uma banda adicional, possivelmente relacionada à glicosilação em um resíduo de asparagina (N144) ou à falha no processamento do sinal de secreção pela levedura. Os resultados confirmam que as proteínas recombinantes mantêm a imunoreatividade à IgE específica, similar aos alérgenos naturais do veneno de *P. paulista*, em concordância com dados previamente descritos na literatura (Bazon et al., 2017; Justo Jacomini et al., 2013; Perez-Riverol et al., 2016).

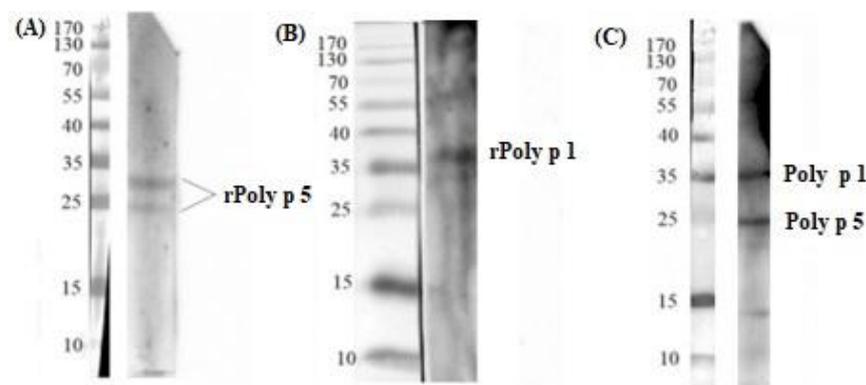


Figura 1 – Imunodeteção de sIgE para os alérgenos recombinantes rPoly p 5 (A) e rPoly p 1 (B) e extrato bruto de veneno de vespa *P. paulista* com alérgenos Poly p 1 e Poly p 5 (C) detectados por sIgE presente em amostras de soros de pacientes alérgicos. (pool das amostras de 11 pacientes).

1.2. Padronização dos ensaios de ELISA para detecção de sIgE

A análise dos níveis de sIgE por ELISA indireto, comparando-se os alérgenos rPoly p1, rPoly p 5 e os presentes nos extrato do veneno (Figura 2), revelou maior diferença de densidade óptica entre os grupos de pacientes e indivíduos não alérgicos ao se utilizar o alérgeno recombinante rPoly p 5, com desempenho comparável ao extrato bruto de *Polybia paulista*, em contraste ao observado com o rPoly p 1.

Estes achados evidenciam uma maior capacidade discriminatória do alérgeno rPoly p 5 entre pacientes alérgicos e de indivíduos não sensibilizados quando comparados ao rPoly p 1, com desempenho semelhante ao observado quando se utilizou o extrato bruto de *P. paulista*. Dessa forma, foi possível definir o melhor ensaio utilizando os alérgenos recombinantes, sendo o rPoly p 5 o mais adequado para o monitoramento longitudinal dos níveis de sIgE durante protocolos de VIT.

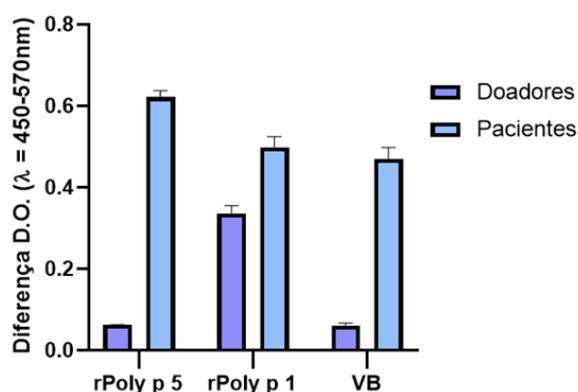


Figura 2 – Comparação dos níveis de sIgE dirigidos aos alérgeno recombinantes *rPoly p 5*, *rPoly p 1* e extrato bruto do veneno de *P. paulista* (VB), a partir de um pool (n=11) de amostras de soro de pacientes alérgicos selecionados e doadores. As barras representam a média ± desvio padrão das duplicatas das densidades ópticas (comprimento de ondas de 450-570 nm) obtidas nos ensaios de ELISA indireto.

1.3. Comparação entre testes de ELISA baseados no uso do alérgeno recombinante rPoly p 5 e extrato bruto do veneno de *P. paulista*

A comparação entre os níveis de sIgE dos pacientes em testes de ELISA baseado no uso do veneno bruto de *P. paulista* frente ao teste utilizando rPoly p 5 apresentou diferenças significativas (p=0,042) apenas nas amostras que foram coletadas no início do protocolo da VIT, sendo que o último destacou-se por apresentar valores de densidades ópticas maiores (Figura 3).

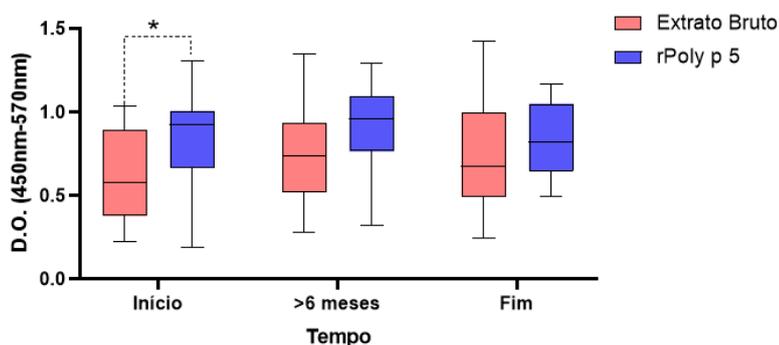


Figura 3 - Comparação dos níveis de sIgE, representados pelos valores de densidade óptica (D.O.) detectados nos testes de ELISA indireto utilizando extrato bruto de veneno de *P. paulista* e *rPoly p 5*, ao longo da imunoterapia. *p < 0,05; teste de Wilcoxon.

Contudo, ao observarmos os resultados apresentados na Figura 4, constatamos que ao longo do tempo da VIT, os resultados convergiram, evidenciado pela alta correlação (Painel E, r=0,76), concordância (Painel F) e ausência de diferença estatística significativa na quantificação de sIgE (Figura 3, p=0,123) nas amostras coletadas ao final do protocolo da VIT. Esses achados indicam que o método

de quantificação de slgE baseado no uso de rPoly p 5 apresentou maior sensibilidade para detecção de slgE dos pacientes em início do protocolo de VIT e alta similaridade e concordância com o teste baseado no uso do extrato total do veneno nas amostras coletadas ao final VIT.

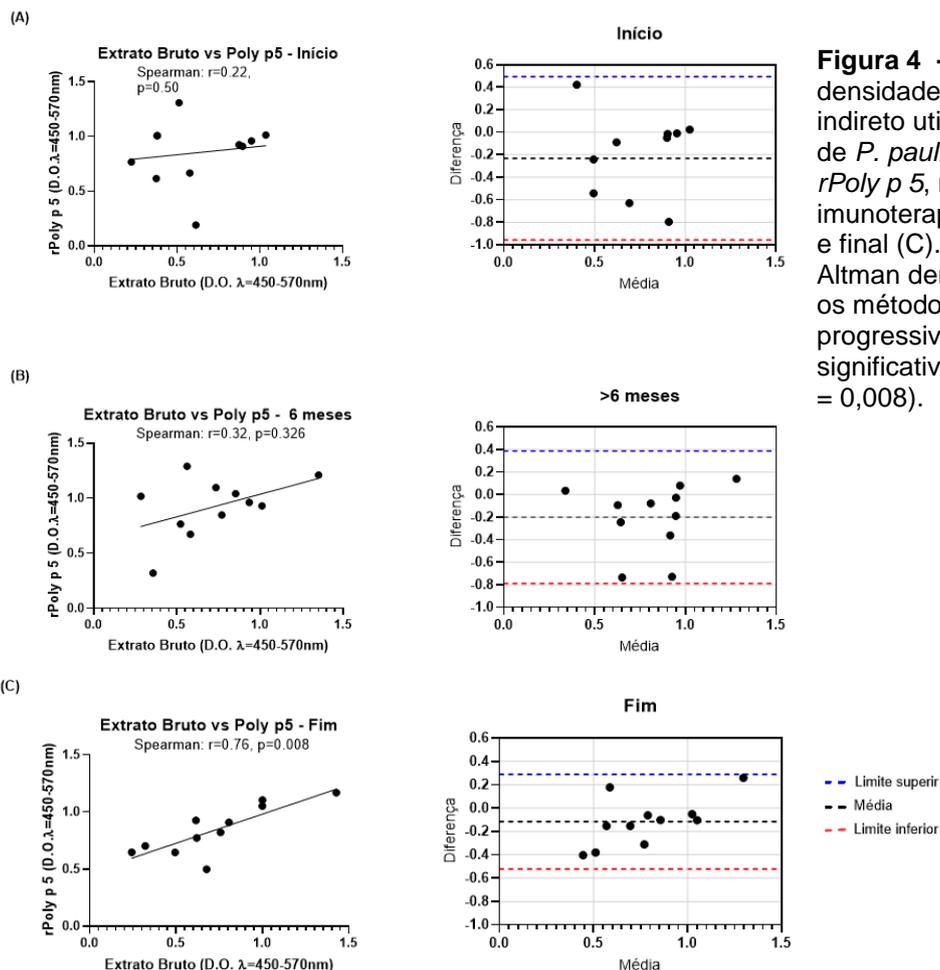


Figura 4 - Correlação entre os valores de densidade óptica (D.O.) obtidos por ELISA indireto utilizando o extrato bruto de veneno de *P. paulista* e o alérgeno recombinante rPoly p 5, nas diferentes fases da imunoterapia: início (A), após >6 meses (B) e final (C). À direita, gráficos de Bland-Altman demonstram a concordância entre os métodos. Observa-se aumento progressivo da correlação, com valor significativo ao final do protocolo ($r = 0,76$; $p = 0,008$).

CONCLUSÕES:

Os resultados apresentados sugerem que o teste de ELISA indireto baseado na utilização do alérgeno rPoly p 5 pode constituir uma ferramenta viável para avaliação e monitoramento da resposta imunológica de pacientes alérgicos à vespa submetidos aos protocolos de VIT, apresentando maior sensibilidade para detecção da slgE no início da terapia e com alta correlação e concordância para o acompanhamento dos desfechos VIT, quando comparados com testes baseados no uso de alérgenos naturais provenientes do extrato do veneno de *P.paulista*.

Todavia, para sua aplicação rotineira, haverá a necessidade de validação adicional que contemple um maior número de amostras a serem testadas. Dessa forma, alérgenos recombinantes derivados dos principais componentes do veneno de himenópteros apresentam potencial para aprimorar a precisão diagnóstica e o acompanhamento terapêutico nas alergias aos venenos destes insetos.

BIBLIOGRAFIA

ABRAM, D. M. et al. **Cross-reactive carbohydrate determinant in *Apis mellifera*, *Solenopsis invicta* and *Polybia paulista* venoms: Identification of allergic sensitization and cross-reactivity.** *Toxins*, v. 12, n. 10, 8 out. 2020.

ANSOTEGUI, I. J. et al. **IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper.** *World Allergy Organization Journal*, v. 13, n. 2, p. 100080, fev. 2020.

BAZON, M. et al. **Heterologous Expression, Purification and Immunoreactivity of the Antigen 5 from *Polybia paulista* Wasp Venom.** *Toxins*, v. 9, n. 9, p. 259, 24 ago. 2017.

BLANK S, BILÒ MB, OLLERT M. **Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: Important steps towards precision medicine.** *Clinical & Experimental Allergy*, v48(4):354–64, Apr 2018.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. **Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, n. 1, p. 45–66, jan. 2000.

JUSTO JACOMINI, D. L. et al. **Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis.** *Toxicon*, v. 64, p. 70–80, mar. 2013.

Palma M.S., “**Hymenoptera Insect Peptides,**” in *Handbook of Biologically Active Peptides*, Elsevier, 2013, pp. 416–422. doi: 10.1016/B978-0-12-385095-9.00058-0.

PEREZ-RIVEROL, A. et al. **Facing Hymenoptera Venom Allergy: From Natural to Recombinant Allergens.** *Toxins*, v. 7, n. 7, p. 2551–2570, 9 jul. 2015.

PEREZ-RIVEROL, A. et al. **Molecular cloning, expression and IgE-immunoreactivity of phospholipase A1, a major allergen from *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) venom.** *Toxicon*, v. 124, p. 44–52, dez. 2016.

PEREZ-RIVEROL, A. et al. **Phospholipase A1-based cross-reactivity among venoms of clinically relevant Hymenoptera from Neotropical and temperate regions.** *Molecular Immunology*, v. 93, p. 87–93, jan. 2018.

G. J. Sturm et al., “**EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera svenom allergy,**” *Allergy*, vol. 73, no. 4, pp. 744–764, Apr. 2018, doi: 10.1111/ALL.13262.

VAN HAGE, M.; HAMSTEN, C.; VALENTA, R. **ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 140, n. 4, p. 974–977, 1 out. 2017.

VINZÓN, S. E. et al. **Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a hypoallergenic antigen 5. Protein Expression and Purification,** v. 73, n. 1, p. 23–30, set. 2010.