

O papel dos alérgenos recombinantes Poly p 1 e Poly p 5 derivados do veneno da vespa *Polybia paulista* em modelo experimental de dessensibilização ao veneno de vespa.

Palavras-Chave: Alergia a veneno de himenóptero, imunoterapia com veneno de vespa, alérgenos recombinantes

Autores(as):

Laís Stephanie Minati, Curso de Biomedicina - PUCCAMP

Juliana de Assis Chagas, Curso de Medicina – PUCCAMP

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

INTRODUÇÃO:

A picada de inseto himenóptero é uma das causas mais comuns de anafilaxia em todo o mundo (PEREZ-RIVEROL A, *et al.*, 2015). O Brasil, abriga uma grande diversidade de himenópteros neotropicais clinicamente importantes (BAZON, M.L *et al.*, 2017). A *Polybia paulista* é uma vespa responsável por causar dezenas de casos fatais de anafilaxia anualmente (DEMSAR L. A. *et al.*, 2021). Para terapia, a imunoterapia a veneno de himenópteros (VIT) (GOLDEN D., 2005) é o único tratamento modificador da doença (BAZON, M.L *et al.*, 2017; LÓPEZ J.F, *et al.* 2022), que, antes era realizada com veneno bruto e associada a complicações, demanda buscas ao uso de novas abordagens como os alérgenos recombinantes (PEREZ-RIVEROL A, *et al.* ,2015; VINZÓN, S. E. *et al.*, 2010).

Alérgenos recombinantes representam uma estratégia promissora para a dessensibilização de pacientes alérgicos, além de maior segurança, especificidade e padronização (JUSTO JACOMINI, D. L. *et al.*, 2014; LÓPEZ J.F, *et al.* 2022; VALENTA R, NIEDERBERGER V, 2007). Possibilita uma exposição gradual com risco reduzido de reação adversas (SARs) (VALENTA R, *et al.*, 2011). A imunoglobulina IgE (sIgE) específica ao alérgeno de veneno é um marcador utilizado no acompanhamento da eficácia da VIT (JAKOB T, *et al.* 2017; LÓPEZ J.F, *et al.* 2022), avaliando a progressão da tolerância imunológica. Os alérgenos principais encontrados são a fosfolipase A1 (Poly p 1), a hialuronidase (Poly p 2) e o antígeno 5 (Poly p 5) presentes no veneno (BAZON, M.L *et al.*, 2017; VINZÓN, S. E. *et al.*, 2010).

Através de modelos experimentais de dessensibilização de camundongos, o trabalho visa monitorar os níveis de imunoglobulina específicas (sIgE) para os alérgenos recombinantes rPoly p 1 e rPoly p 5 em modelos experimentais de camundongos em VIT e regular o perfil de células reguladoras. Esses testes podem contribuir significativamente para a eficácia e segurança da imunoterapia com venenos no Brasil.

METODOLOGIA:

Os alérgenos do veneno bruto foram obtidos das glândulas de veneno de *P. paulista* e semi-purificados por ultrafiltração utilizando membranas de 3kDa. Os alérgenos Poly p 1 e Poly p 5 recombinantes foram produzidos por expressão heteróloga em *E. coli* (PEREZ-RIVEROL, *et al*, 2016) e levedura *Pichia pastoris* (BAZON, M.L *et al*, 2017), respectivamente. Camundongos fêmeas BALB/c (n = 10, aprovação do comitê de ética animal institucional nº 5732-1/2021) foram imunizados com seis doses intradérmicas (i.d.) de 20µg do extrato proteico do veneno de *Polybia paulista*, ao longo de seis semanas. Após sete dias, os camundongos foram sangrados para obtenção dos soros pré-dessensibilização. Após 14 dias, os camundongos foram divididos em dois grupos de cinco camundongos cada (tratado e controle), e o grupo tratado recebeu três doses i.d. de rPoly p 1 e rPoly p 5 (20µg de cada). O grupo controle recebeu apenas solução salina. Vinte dias após a última dose, os camundongos foram desafiados por administração intraperitoneal (i.p.) de 20µg do extrato de veneno de *P. paulista*, e após 30 minutos foram eutanasiados e obtidos soros e suspensões de células esplênicas. Essas células foram estimuladas in vitro com 3 µg/ml do extrato de veneno de *P. paulista* por 96 horas, seguido de marcação celular para marcadores de células T e B regulatórias (Tregs) para avaliação por citometria de fluxo. As amostras de soro foram utilizadas em ensaios ELISA para avaliar sIgE, sIgG1 e protease 1 de mastócitos murinos (mMcpt-1). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações entre os grupos tratado e controle, e o teste de Bonferroni para comparar diferentes pontos temporais ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1.1 Avaliação da resposta imune humoral frente a dessensibilização com alérgenos recombinantes rPoly p 1 e rPoly P5

O protocolo de dessensibilização utilizando rPoly p 1 em associação com rPoly p5 levou a uma redução significativa de sIgE e sIgG1 em camundongos previamente sensibilizados, como observamos na figura 1 nos gráficos (A) e (B), respectivamente. Adicionalmente, notamos que os animais tratados quando submetidos ao desafio com o veneno de *P. paulista*, apresentaram uma produção significativamente menor do fator de ativação de mastócitos mMcpt-1 do que o grupo controle (Painel C). Em conjunto estes resultados indicam que o protocolo de dessensibilização utilizando os alérgenos recombinantes foi capaz de reduzir a produção de imunoglobulinas responsáveis pelo reconhecimento dos alérgenos e disparo da ativação das células efectoras da resposta alérgica como evidenciamos por uma baixa ativação de mastócitos ao observarmos redução nos níveis de proteases produzidas por estas células. Essa modulação na resposta imunológica frente à dessensibilização é compatível com os efeitos esperados da imunoterapia alérgeno-específica como demonstram os dados da literatura (SCHIENER, M. *et al*. 2017).

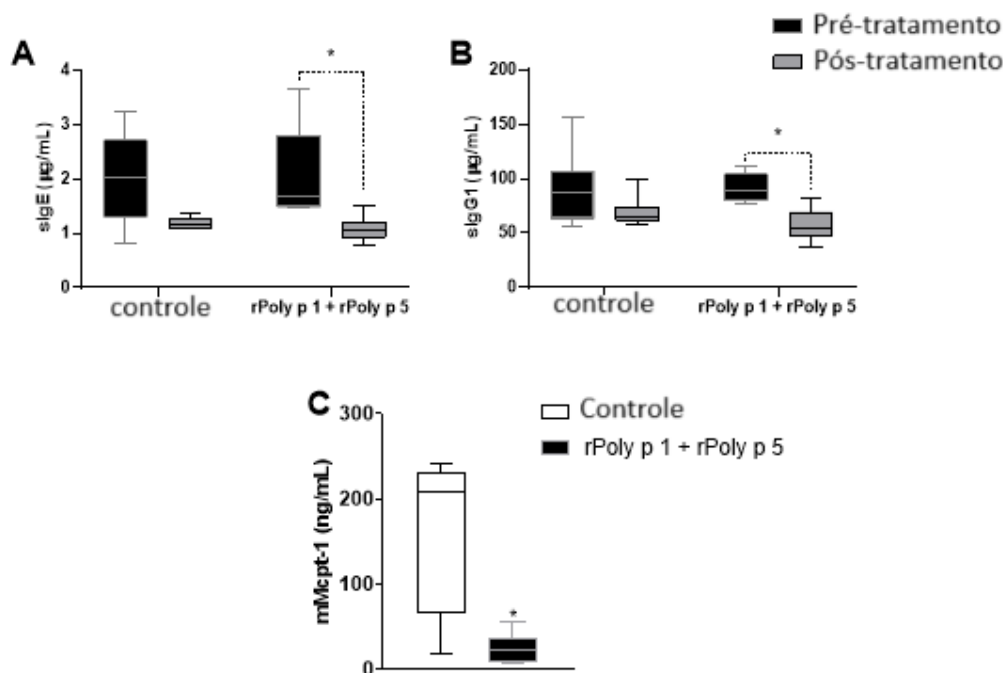


Figura 1. Efeitos do protocolo de dessensibilização com alérgenos recombinantes rPoly p 5, rPoly p 1 na resposta imune humoral em modelo experimental de murino de sensibilização aos alérgenos do veneno de *P.paulista*. Os gráficos representam a quantificação de sIgE (painel A) de sIgG1 (painel B) comparando-se os grupos antes e após o tratamento e a produção de protease 1 de mastócitos nos grupos controle e tratados após desafio com o veneno de *P.paulista*.

1.2. Perfil das populações de células T reguladoras (Tregs) e B reguladoras (Bregs)

Células T reguladoras são populações de células T cruciais para a modulação das respostas de células na periferia, dentre elas destacam-se a subpopulação de células TCD4⁺ expressando os fatores de transcrição Foxp3 e Helios (Figura 2 – Painel A) (Morina et al., 2023). Nesse sentido, observamos que o protocolo de dessensibilização utilizando rPoly p 1 em associação com rPoly p5 levou a um aumento de Tregs CD4⁺Foxp3⁺Helios⁺ após desafio antigênico, quando comparados com o grupo controle (Figura 2 – Painel B).

Estudos revelam que células B reguladoras, expressando os marcadores CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ (Figura 2 – Painel C), podem estar envolvidas nos mecanismos imuno reguladores envolvidos na dessensibilização induzida pela imunoterapia (Satitsuksanoa, et al., 2025; Palomares O., et al., 2017). Conforme podemos observar no painel B (figura 2) apesar de não observarmos diferenças na frequência da população das Bregs na comparação entre os grupos (painel D), foi observado superexpressão de PD-L1 nas Bregs no grupo tratado (Painel E), indicando um perfil de ativação maior destas células neste grupo.

Em conjunto os resultados apresentados apontam que protocolos de dessensibilização com alérgenos recombinantes elicitam subpopulações linfocitárias com perfil regulador que atuariam modulando a reposta imunológica aos alérgenos derivados dos venenos de himenópteros.

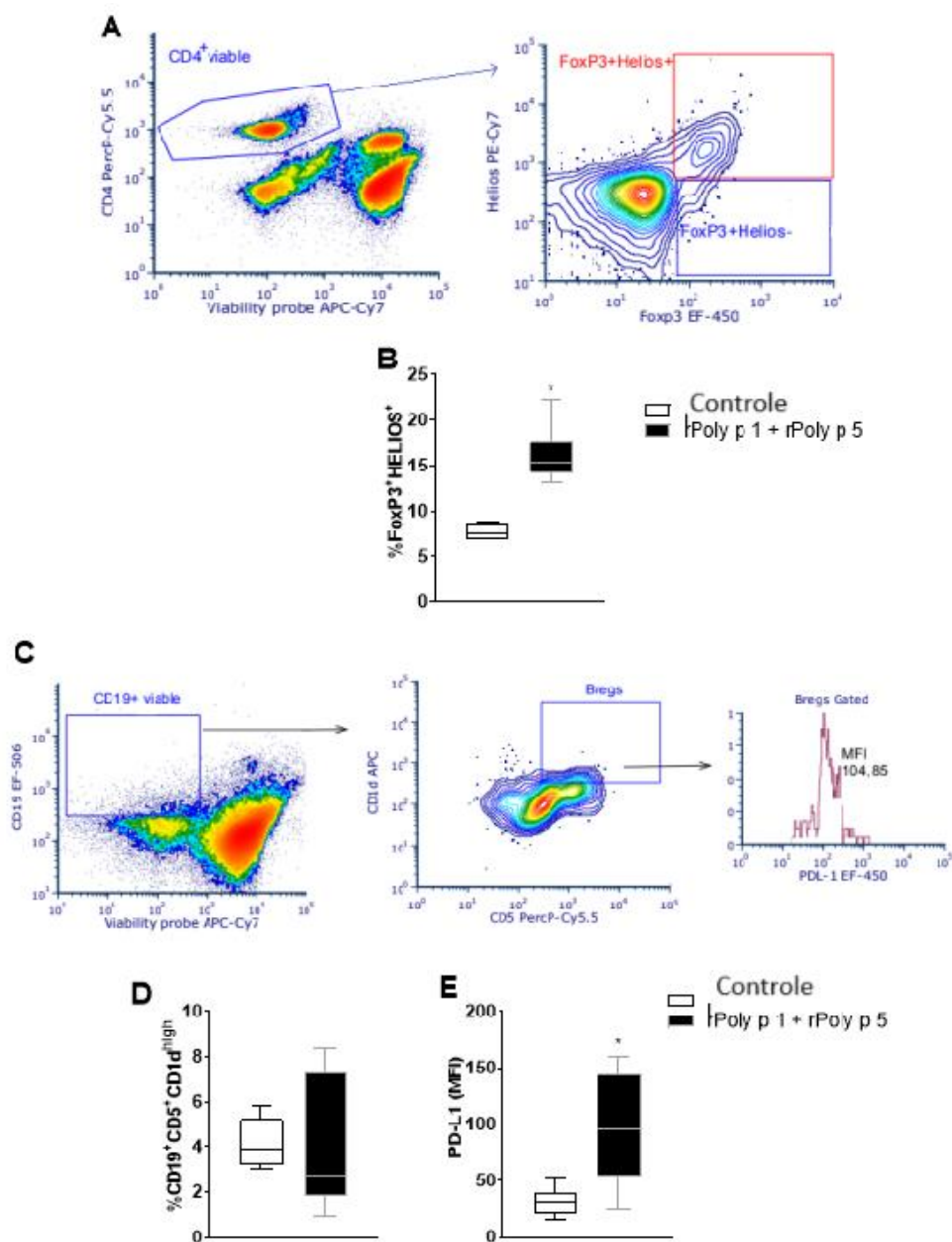


Figura 2. Perfil das populações de linfócitos reguladores em modelo experimental de alergia ao veneno de *P. paulista* submetidos a protocolo de dessensibilização com alérgenos recombinantes rPoly p 5, rPoly p 1. Paineis A - análise fenotípica população de Tregs CD4⁺ FoxP3⁺Helios⁺. Painel B - frequência de Tregs nos grupos controles e tratados. Painel C - análise fenotípica de células (Bregs) CD19⁺CD5⁺CD1d⁺. Painel D - frequência de Bregs nos grupos controles e tratados. Painel E - média das intensidades de fluorescência do marcador PD-L1 em Bregs dos grupos controles e tratados.

CONCLUSÕES:

O uso dos alérgenos rPoly p 1 e rPoly p 5 em protocolos de dessensibilização pode ser uma estratégia promissora para modular respostas imunes alérgicas induzidas pelo veneno de vespa, reduzindo a produção de imunoglobulinas específicas responsáveis pela ativação de células efetoras (mastócitos) e aumentando a atividade de populações de células com perfil regulador na periferia.

BIBLIOGRAFIA

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

DEMSAR L. A. *et al.* ***Hymenoptera* Venom Immunotherapy: Immune Mechanisms of Induced Protection and Tolerance.** *Cells*. v. 10, n. 7, p. 1575, 22 jun. 2021.

GOLDEN D.B. **Insect sting allergy and venom immunotherapy: a model and a mystery.** *J Allergy Clin Immunol*. v. 115, n. 3, p. 439–447, mar. 2005.

JAKOB T, MULLER U, HELBLING A, SPINELL E. **Component resolved diagnostics for hymenoptera venom allergy.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. v. 17, n. 5, p. 363–372, out. 2017

JUSTO JACOMINI, D. L. *et al.* **Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (*Hymenoptera*, *Vespidae*) venom.** *Toxicon*, v. 82, p. 104–111, maio 2014.

LÓPEZ J.F, *et al.* **Mechanisms and biomarkers of successful allergen-specific immunotherapy.** *Asia Pac Allergy*. v. 12, n. 4, e45, 31 out. 2022.

MORINA, L. *et al.* **Co-expression of Foxp3 and Helios facilitates the identification of human T regulatory cells in health and disease.** *Front Immunol*, v. 14, e1114780, 7 jun. 2023.

PEREZ-RIVEROL A, *et al.* **Facing Hymenoptera Venom Allergy: From Natural to Recombinant Allergens.** *Toxins (Basileia)*. 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, 15 dez. 2016.

PALOMARES, O. *et al.* **Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells.** *Immunol Rev*, v. 278, n. 1, p. 219–236, jul. 2017.

SATITSUKSANO, P. *et al.* **Allergen-specific B cell responses in oral immunotherapy-induced desensitization, remission, and natural outgrowth in cow's milk allergy.** *Allergy*, v. 80, n. 1, p. 161–180, jan. 2025

SCHIENER, M. *et al.* **Imunoterapia específica para alérgenos de alergia ao veneno de *Hymenoptera* – também uma questão de diagnóstico.** *Hum Vaccin Immunother*, v. 13, n. 10, p. 2467–2481, 3 out. 2017.

VALENTA R, *et al.* **Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens.** *Allergy*. v. 66, n. 6, p. 775–783, jun. 2011.

VALENTA R, NIEDERBERGER V. **Recombinant allergens for immunotherapy.** *J Allergy Clin Immunol*. v. 119, n. 4, p. 826–830, abr. 2007.

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.