

AVALIAR O BLOQUEIO DA MOLÉCULA DE IgE PELA AÇÃO DE  
ÁCIDOS GLUTÂMICOS MODIFICADOS COMO TERAPIA  
ALTERNATIVA PARA TRATAMENTO DA ALERGIA

DÉBORA MOTHÉ DE CAMPOS MESQUITA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
FEVEREIRO - 2016

AVALIAR O BLOQUEIO DA MOLÉCULA DE IgE PELA AÇÃO DE  
ÁCIDOS GLUTÂMICOS MODIFICADOS COMO TERAPIA  
ALTERNATIVA PARA TRATAMENTO DA ALERGIA

DÉBORA MOTHÉ DE CAMPOS MESQUITA

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Centro de Biociências e Biotecnologia da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Mestre em Biociências e Biotecnologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
FEVEREIRO - 2016

**Dedico este trabalho**

aos meus familiares e amigos que  
sempre me apoiaram em todos os  
momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao concluir mais uma etapa da minha vida, quero agradecer a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Em primeiríssimo lugar, agradeço a Deus pela força, pela sabedoria e tantas bênçãos que tem derramado em minha vida e por me conceder mais essa bênção. Obrigada Senhor!

Aos meus familiares, meu pai José Henriques, minha mãe Lediméa, meus irmãos Guilherme, Hugo, Mateus e Wellington, meu sobrinho Jeff, por todo apoio, zelo e compreensão. Vocês são meu exemplo de vida. Obrigada por terem me ajudado em todos os momentos!

Agradeço a minha orientadora professora Olga por sua dedicação e amizade, sendo um grande exemplo pra mim, na vida pessoal e profissional.

Aos professores Edésio, Milton e Willian por aceitarem o meu convite para fazer parte da Comissão Examinadora desse trabalho.

A minha amiga e revisora, Natália, pela dedicação, incentivo, paciência, e amizade que foram essenciais para conclusão de mais um trabalho.

Aos meus amigos companheiros de pesquisa do laboratório, Jucélia, Isabela, Thais, Francianne, Paula, Grazielle, Carol e Lara por todo auxílio nos estudos, na execução de experimentos e pela imprescindível amizade.

Agradeço a família que ganhei Alves e Mesquita, obrigada pelo carinho e apoio de todos, por compreender a minha ausência. Ao meu marido, Renato, por todo incentivo, companheirismo, pela paciência e compreensão nos momentos de tensão, enfim pelo seu carinho e amor que me ajudaram a enfrentar obstáculos e concluir mais uma etapa da minha vida.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.2 – Alérgenos vegetais.....	3
1.3 – Albumina 2S de mamona .....	5
1.3.1 – Propriedades alergênicas das albuminas 2S de mamona .....	6
1.4 – Hipersensibilidade .....	7
1.5 – Epitopos ligantes de IgE.....	11
1.6 – O ácido glutâmico e sua função neurológica .....	14
1.7 - Estratégias terapêuticas para o tratamento da alergia .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 – Objetivo geral .....	19
2.2 - Objetivos Específicos.....	19
3.1 - Obtenção das albuminas 2S .....	20
3.2 - Protocolos de imunizações .....	20
3.2.1 – Avaliação da resposta imunológica dos camundongos: .....	21
3.3 –Ensaio de bloqueio de IgE com ácidos glutâmicos modificados .....	23
<b>4 - RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 – Quantificação de IgE nos soros anti-albumina 2S de mamona produzidos em camundongos. ....	25
4.2.1 – Eficácia comparativa da ação bloqueadora .....	27
4.2.2 – Curva de concentração utilizando o aminoácido N-(4-nitrobenzoi)-L- ácido glutâmico (E4) .....	28
4.3 - Avaliação da resposta imunológica no modelo animal: .....	29
4.3.1- Imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona:.....	29
4.3.1.2 - Avaliação da resposta IgG1 específica .....	31
4.3.2 - Imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona:.....	32
4.3.2.3- Avaliação da resposta IgE específica.....	35
4.3.3- Avaliação da resposta IgE específica após dose de reforço .....	35

<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>6 – CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estruturas da planta <i>R. communis</i> .....	1
<b>Figura 2</b> - Estrutura Primária do precursor das Albuminas 2S. ....	6
<b>Figura 3</b> - Mecanismos da resposta alérgica.).....	10
<b>Figura 4</b> - Estrutura primária das isoformas de albuminas 2S de <i>R. communis</i> , Ric c 1 e Ric c 3.....	12
<b>Figura 5</b> - Morte neuronal por excitotoxicidade glutamatérgica. ....	15
<b>Figura 6</b> - Cronograma do protocolo experimental de imunização.....	21
<b>Figura 7</b> - Quantificação de IgE nos soros anti-albumina 2S de mamona produzidos em camundongos.. ....	25
<b>Figura 8</b> - Ensaio imunoenzimático para avaliar o bloqueio de IgE pelos ácidos glutâmicos modificados.....	26
<b>Figura 9</b> - Relação entre a concentração dos cinco agentes bloqueadores e o bloqueio de IgE.. ....	27
<b>Figura 10</b> - Relação entre a concentração do aminoácido (E4) e o bloqueio de IgE.. ....	29
<b>Figura 11</b> - Produção de IgG específica nos camundongos submetidos a imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona. ....	30
<b>Figura 12</b> - Produção de IgG1 específica nos camundongos submetidos a imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona. ....	31
<b>Figura 13</b> - Produção de IgE específica nos camundongos submetidos a imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona. ....	32
<b>Figura 14</b> - Produção de IgG específica nos camundongos submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona. ....	33
<b>Figura 15</b> - Produção de IgG1 específica nos camundongos submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona. ....	34
<b>Figura 16</b> - Produção de IgE específica nos camundongos submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona.).....	35
<b>Figura 17</b> - Produção de IgE específica nos camundongos inicialmente submetidos a imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona. ....	36
<b>Figura 18</b> - Produção de IgE específica nos camundongos inicialmente submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona. ....	37

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela I:</b> Relação de ácidos glutâmicos modificados (Sigma-Aldrich) utilizados nos ensaios de bloqueio.....	24
---	----



## RESUMO

A mamona apresenta em suas sementes e pólen proteínas alergênicas pertencentes à classe das albuminas 2S, denominados Ric c 1 e Ric c 3. Estas proteínas, são capazes de sensibilizar um indivíduo alérgico levando a um aumento da produção de Imunoglobulina E (IgE) desencadeando uma reação alérgica. A região de interação do alérgeno com IgE é denominada epitopo ligante de IgE. Os seis epitopos ligantes de IgE identificados nos principais alérgenos de mamona apresentam dois resíduos de ácido glutâmico, importantes para a ligação a IgE e, deflagração da alergia. Devido à importância econômica do óleo de mamona, o plantio desta oleaginosa é crescente e, alérgenos, presentes no pólen são dissipados no ar expondo os trabalhadores rurais e moradores próximos a área de cultivo à riscos de saúde. O tratamento mais frequente para a alergia é o uso de anti-histamínicos que apresenta efeitos colaterais como sonolência. Neste trabalho, uma nova abordagem para tratamento da alergia é avaliada, com intuito de investigar a atuação de ácidos glutâmicos modificados como agentes bloqueadores de IgE. Foram pesquisados cinco compostos: Ácido – D - glutâmico; ácido- N-metil-L- glutâmico; ácido – N -acetil-L- glutâmico; ácido - N- (4-nitrobenzoil)-L- glutâmico e ácido - N- carbamil-L- glutâmico. Inicialmente, analisamos a presença de IgE nos soros anti-albuminas 2S produzidos em camundongos BALB/c. Para obtenção de soro com altos níveis de IgE, outros animais foram submetidos a dois diferentes protocolos de imunização, um com 1 µg de albumina 2S de mamona e 4 mg de hidróxido de alumínio (adjuvante) e o segundo grupo com dose de 10 µg de albumina 2S de mamona e 5 mg do adjuvante. Avaliamos o perfil de resposta desencadeado nos animais por ensaios de ELISA. Em seguida, realizamos o ensaio de bloqueio de IgE por ELISA, incubando o soro com cada um dos cinco ácidos glutâmicos modificados. Avaliamos o percentual de bloqueio de IgE pelos aminoácidos em diferentes volumes (10 µL, 15 µL e 20 µL) da solução de concentração de 0,5 µM/µL. Nas etapas de imunização os animais foram pouco estimulados a produzirem anticorpos específicos, uma dose reforço de 10 µg foi necessária para a produção de soros enriquecidos em IgE. Através dos ensaios de bloqueio de IgE por ELISA identificamos dois compostos com boa ação bloqueadora ácido - N- (4-nitrobenzoil)-L- glutâmico e ácido - N- carbamil-L- glutâmico. O bloqueio de IgE por compostos derivados de ácido glutâmico pode ser uma abordagem para o tratamento da alergia, embora necessite ainda de estudos *in vivo*. Espera-se que este tratamento possa ser eficaz para tratamento da alergia causada não apenas pelas albuminas 2S de mamona, mas também por outros alérgenos.

**Palavras-chave:** albuminas 2S, alergia, terapia alternativa, ácido glutâmico modificado

## ABSTRACT

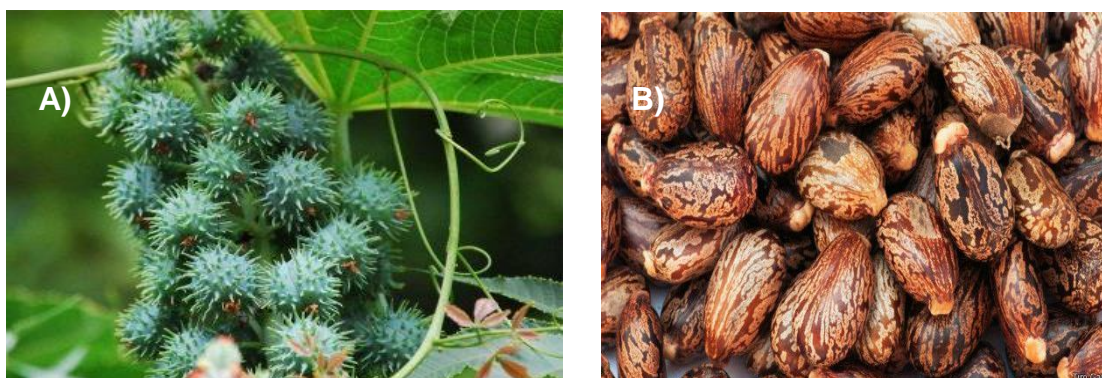
Castor bean presents in its seeds and pollen allergenic proteins belonging to the class of 2S albumin, called Ric c 1 and Ric c 3. These proteins are able to sensitize an allergic individual leading to an increased production of immunoglobulin E (IgE) triggering a allergic reaction. The allergen with IgE interaction region is called IgE binding epitope. The six IgE binding epitopes identified in the main castor allergens have two glutamic acid residues important for binding to IgE and allergy deflagration. Due to the economic importance of castor oil, the planting of this oilseed is growing and allergens present in pollen are dissipated in the air exposing farm workers and residents near the growing area of health risks. The most common treatment for allergies is the use of antihistamines, which presents side effects such as drowsiness. In this work, a new approach to allergy treatment is evaluated in order to investigate the role of glutamic acids modified as blockers of IgE agents. They searched five compounds: acid - D-glutamic; acid - N-methyl-L-glutamic; acid - N-acetyl-L-glutamic; acid - N- (4-nitrobenzoyl) -L-glutamic and acid - N-carbamoyl-L-glutamic. Initially, we analyzed the presence of IgE in the anti-serum albumin 2S produced in BALB/c. To obtain high levels of serum IgE, other animals were submitted to two different immunization protocols with 1 ug of castor seed 2S albumin and 4 mg aluminum hydroxide (adjuvant) and the second dose group 10 ug of castor 2S albumin and 5 mg of adjuvant. We evaluate the response profile triggered in animals by ELISA assays. Then, we perform the IgE by ELISA blocking assay by incubating the serum with each of the five modified glutamic acids. We evaluated the IgE blocking percentage of amino acids in different volumes (10  $\mu$ L, 15  $\mu$ L, and 20  $\mu$ L) of the solution of concentration 0.5 uM / $\mu$ L. In steps immunization the animals were slightly stimulated to produce specific antibodies, a dose of 10  $\mu$ g reinforcement was necessary for the production of enriched sera for IgE. Through IgE by ELISA blocking assays identified two compounds with good blocking action: acid - N- (4-nitrobenzoyl) -L-glutamic and acid - N-carbamoyl-L-glutamic. IgE blocking compounds derived from glutamic acid may be an approach for the treatment of allergy, although need for in vivo studies. It is expected that this treatment can be effective to treat allergy caused not only by the castor 2S albumins, but also by other allergens.

**Keywords:** 2S albumin, allergy, alternative therapy, glutamic acid modified

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 – Potencial econômico da mamona

*Ricinus communis*, é uma planta pertencente à família *Euphorbiaceae*, cuja origem é relatada como sendo na Etiópia, devido sua capacidade de adaptação hoje é encontrada em diversas partes do mundo. Admite-se que esta planta foi introduzida no continente americano com a chegada dos europeus juntamente com a importação dos escravos africanos (CHAMBI *et al.*, 2014; CARTAXO *et al.*, 2004). No Brasil, por ser predominante o clima tropical, a mamona apresentou excelente adaptação, onde é conhecida como mamoneira, rícino, carrapateira e palma-de-cristo. A sua rusticidade faz com que esta seja encontrada em diferentes ambientes, não havendo terreno baldio, beira de estrada, plantação abandonada ou mata onde esta planta não seja encontrada (AZEVEDO E BELTRÃO, 2007; CARTAXO *et al.*, 2004; FORNAZIERE JÚNIOR, 1986). A figura 1 abaixo apresenta a mamoneira com seus frutos (A) e suas sementes (B).



**Figura 1** - Estruturas da planta *R. communis*. A) A mamoneira e seus frutos; (Disponível em: <[http://beneficiosnaturais.com.br/wp-content/uploads/2014/06/mamona\\_beneficios-e-propriedades.jpg](http://beneficiosnaturais.com.br/wp-content/uploads/2014/06/mamona_beneficios-e-propriedades.jpg)> acesso em: 23/01/2016) e B) suas sementes. (BBC Brasil, 2003).

A mamona é considerada uma cultura importante, há relatos desde a antiguidade do uso do óleo extraído das suas sementes para fins medicinais e como azeite para iluminação (FORNAZIERE JÚNIOR, 1986; SANTOS *et al.*, 2007). Atualmente, o óleo de rícino é utilizado na indústria farmacêutica e química para fabricação de diversos produtos, tais como, cosméticos, polímeros, lubrificantes e pode também ser empregado para a produção do biodiesel (CHAMBI *et al.*, 2014; FREITAS, 2011).

O biodiesel obtido a partir do óleo de mamona possui custo mais baixo de produção em comparação com o obtido a partir de outras oleaginosas, devido à tolerância desta planta a seca, adaptação às condições adversas de crescimento, alto teor de óleo de suas sementes, diversidade nas regiões de cultivo e, por fim, a simplicidade para as condições de armazenamento. A maior parte das cultivares plantada comercialmente no Brasil possui teor de óleo variando entre 45% e 50% (BERMAN, 2011). A mamoneira é encontrada em praticamente todo território brasileiro, contudo por ser uma planta tolerante à seca e à temperatura elevada, abrange maior área de cultivo na região nordeste (GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2009).

A mamona possui compostos tóxicos e alergênicos em várias partes de sua estrutura. Nas folhas e frutos encontra-se o alcaloide volátil ricinina, substância responsável por causar sintomas neuromusculares, enquanto que as sementes contêm a proteína ricina que é altamente tóxica. Além desses componentes tóxicos, é também encontrado nas sementes e no pólen da mamona, um grupo de glicoproteínas denominado complexo CB-1A - Castor-bean allergen, uma mistura de proteínas de baixo peso molecular que apresentam propriedades alergênicas (LORENZI, *et al.*, 2011; GODOY *et al.*, 2009; GARCIA-GONZALEZ, *et al.* 1999). Este complexo é formado por cerca de 20 isoformas de proteínas com massa molecular entre 10 e 18 kDa, sendo pertencentes à família das albuminas 2S. Duas isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, foram sequenciadas e seis epitopos alergênicos identificados (FELIX *et al.*, 2008; SILVA JR. *et al.*, 1996; MACHADO E SILVA, 1992).

Durante o processamento industrial das sementes da mamona para obtenção do óleo é gerado outro produto com valor econômico, a torta. Este coproduto é rico em proteínas, fibras, possui alto teor de nitrogênio, fosfato e potássio, sendo utilizada como substrato para plantio de hortaliças, além de possuir propriedade nematicida. As pessoas ao manusearem o adubo, entram em contato com alérgenos presentes na torta (GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2011). As inúmeras vantagens econômicas relacionadas ao uso da mamona tornam o seu cultivo crescente em diversas partes do Brasil, no entanto, devido à presença de compostos alergênicos nas sementes e no pólen, os trabalhadores rurais e a população que reside próximo à área de plantio e processamento, serão expostos aos alérgenos presentes nessa planta. Dessa forma, é de extrema importância o conhecimento de

epitopos alergênicos presentes na estrutura das proteínas da mamona, com o objetivo de desenvolver novas estratégias para a prevenção e tratamento da alergia desencadeada por esses alérgenos ou outras proteínas alergênicas que possuam características estruturais semelhantes.

## **1.2 – Alérgenos vegetais**

Os alérgenos, geralmente, são pequenas proteínas solúveis, ou em forma de partículas inaláveis, que podem provocar uma reação alérgica em indivíduos atópicos, cujo sistema imune reconhece essas substâncias como estranhas (os antígenos). Dessa forma, os alérgenos, são capazes de: I) sensibilizar ao induzir a produção de anticorpos de alta afinidade, especialmente da classe IgE, pelo sistema imune; II) ligar-se aos anticorpos IgE específicos; e III) desencadear uma reação alérgica em um indivíduo sensibilizado, isto é o que leva a sintomas de alergia (WOODFOLK *et al.*, 2015; AALBERSE, 2000).

As proteínas alergênicas presentes nas plantas podem desempenhar diferentes funções para o vegetal, tais como, reserva energética nas sementes, atividade enzimática, e outros ainda se apresentam como proteínas estruturais. Estes alérgenos também podem desempenhar função de defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos (NAKAMURA E TESHIMA, 2013; BREITENEDER E RADAUER, 2004). Dentre as classes de proteínas com propriedades alergênicas, e que constituem reserva nas sementes, estão as albuminas e globulinas, as quais são identificadas de acordo com o coeficiente de sedimentação em albuminas 2S e globulinas 7S e 11S (PASTORELLO *et al.*, 2001).

A maioria dos alérgenos já identificados em plantas, geralmente, têm baixo peso molecular, apresenta ligações dissulfeto e pertence a apenas algumas famílias de proteínas indicando a presença de estruturas conservadas e atividades biológicas que determinam suas propriedades alergênicas (NAKAMURA E TESHIMA, 2013; BREITENEDER E RADAUER, 2004). As proteínas alergênicas são agrupadas na mesma família quando possuem uma identidade residual igual ou maior do que 30%; ou se apresentarem menor identidade na sua sequência, porém apresentam funções e estruturas similares. Nesse último caso, as famílias com características estruturais e funcionais semelhantes são agrupadas em superfamílias (BREITENEDER E RADAUER, 2004).

Os grandes grupos de alérgenos vegetais pertencem às superfamílias Cupin e Prolaminas. Na superfamília cupin estão incluídas as proteínas de reserva de sementes do tipo vicilina e legumina, que constituem os principais alérgenos presentes no amendoim, soja, lentilhas, nozes, avelã e gergelim (BREITENEDER E MILLS, 2005). A maioria dos membros caracterizados da superfamília prolamina são proteínas de sementes. Nessa superfamília são encontrados alérgenos, tais como, as albuminas 2S, as proteínas de transferência de lipídeos não-específicos (nsLTPs), inibidores de  $\alpha$ -amilase e tripsina e as prolaminas de cereais (BREITENEDER E MILLS, 2005).

Os alérgenos agrupados na superfamília das prolaminas são proteínas com massas moleculares de aproximadamente 15 kDa, e apresentam oito ou mais resíduos de cisteína conservados. Estas proteínas são estáveis ao serem submetidos ao processamento térmico e a proteólise (BREITENEDER E MILLS, 2005; MORENO E CLEMENTE, 2008). As proteínas de reserva pertencentes às albuminas 2S são os principais alérgenos presentes em sementes de diversas plantas. Alguns alérgenos desta classe foram identificados na mostarda, Sin a 1 e Bra j 1 (MENÉNDEZ-ARIAS *et al.*, 1988; MONSALVE *et al.*, 1993), no amendoim, Ara h 6 e Ara h 7 (KLEBER-JANKE *et al.*, 1999), em nozes, Jug r 1 (ROBOTHAM *et al.*, 2002), na castanha do Brasil (BREITENEDER E MILLS, 2005), soja (LIN *et al.*, 2006) e no gergelim (WOLFF *et al.*, 2003). Outros alérgenos pertencentes à classe das albuminas 2S também foram identificados no pinhão manso, Jat c 1 (MACIEL *et al.*, 2009), e na mamona Ric c 1 e Ric c 3 (SHARIEF E LI, 1982; MACHADO E SILVA, 1992).

A maioria das sementes que possuem os alérgenos da classe das albuminas 2S é usada como fonte alimentar e, por isso, representam a causa frequente de reações alérgicas que ocorrem em indivíduos previamente sensibilizados. Este fato ocorre devido a possibilidade de reação cruzada entre proteínas de diferentes fontes com o mesmo anticorpo IgE presentes nos indivíduos atópicos. Estas reações ocorrem porque estes alérgenos compartilham epitopos similares capazes de gerar uma resposta imune (PASTORELLO *et al.*, 2001). Os alérgenos de plantas podem desencadear reações hipersensibilidade do tipo I (alergia) em algumas pessoas sensíveis após a inalação do pólen, através do contato e, também, pelo consumo de alimentos de origem vegetal. Os sintomas alérgicos podem variar de acordo com o

grau de exposição, resultando em rinite, espirros, coceira, diarreia, vômitos e, até evoluir para uma grave reação alérgica sistemática, a anafilaxia (NAKAMURA E TESHIMA, 2013).

### 1.3 – Albumina 2S de mamona

As albuminas 2S de mamona são proteínas heterodiméricas, apresentam um esqueleto conservado de oito resíduos de cisteínas e, possuem massa molecular de 10 - 18 kDa, altos teores de arginina, serina e glutamina (DEUS-DE-OLIVEIRA E MACHADO, 2011; BREITENEDER E RADAUER, 2004; MACHADO & SILVA, 1992). Em 1943, Spies e Coulson isolaram da semente de mamona uma fração proteica de baixo peso molecular, estável a altas temperaturas, que foi denominada CB-1A (castor bean allergens). No ano de 1947 a hipersensibilidade desencadeada por mamona foi descrita pela primeira vez e em 1977, Li e colaboradores isolaram e caracterizaram uma proteína das sementes de *Ricinus communis* L. de baixo peso molecular que apresentou propriedades similares àquelas da proteína anteriormente isolada de mamona. Posteriormente, no ano de 1978, Youle e Huang concluíram que CB-1A era a mesma proteína descrita por Li *et al.* em 1977.

Sharief e Li em 1982 determinaram a estrutura primária de CB-1A. A proteína descrita por Sharief e Li foi denominada, segundo a nomenclatura prevista para os alérgenos, como Ric c 1. Esta proteína possui baixo peso molecular, alto teor de glutamina e, é composta de duas cadeias polipeptídicas ligadas por duas pontes dissulfeto: uma menor com 34 resíduos de aminoácidos (cadeia leve) e outra maior, com 61 resíduos (cadeia pesada). Posteriormente outra proteína alergênica, também com baixo peso molecular e alto teor de glutamina foi identificada em *R. communis*. Esta proteína, denominada, Ric c 3, também, apresenta duas cadeias polipeptídicas: a cadeia leve com 41 resíduos de aminoácidos e a cadeia pesada com 67 resíduos, ligadas por duas pontes dissulfeto (MACHADO E SILVA 1992; SILVA *et al.*, 1996). As isoformas alergênicas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são sintetizadas como um único precursor (figura 2), com 237 resíduos de aminoácidos. O precursor sofre processamento pós-traducional, por endopeptidases e carboxipeptidases, perdendo alguns fragmentos peptídicos para assim dar origem as isoformas, Ric c 1 e Ric c 3 (IRWIN *et al.*, 1990).

SFAYRRITTEID**ESKGEREGSSSQQRQEVQRKDLSSCERYL**  
**RQSSSRSTGEEVLRMPGDENQQESQQLQQCCNQVKQVRD**  
**ECQCEAIKYIAEDQIQGQLHGEESEVAQRAGEIVSSCGVRC**  
**MRQTRTNSQGCRCGQIQEQQNLRQCQEYIKQQVSGQGPRRS**  
**DNQERSLRGCCDHLKMQMSQCRCEGLRQAIEQQQSQGQL**  
**QGQDVFEAFRTAANLLPSMCGVSPTRF**

**Figura 2** - Estrutura Primária do precursor das Albuminas 2S. Verde = cadeia leve e cadeia pesada de Ric c 3; Marrom= cadeia leve e cadeia pesada de Ric c 1; Cinza = peptídeos que são eliminados durante o processamento (SILVA *et al.*, 1996).

### 1.3.1 – Propriedades alergênicas das albuminas 2S de mamona

As isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, foram caracterizadas como proteínas alergênicas, há muitos anos (SHARIEF E LI, 1982; THORPE *et al.*, 1988; MACHADO E SILVA, 1992; Silva *et al.*, 1996). Tanto Ric c 1 quanto Ric c 3 são resistentes podendo, mesmo após os tratamentos desnaturação térmica e química, provocar a desgranulação de mastócitos previamente ativados com soro contendo IgE específica contra estes alérgenos. No entanto, ainda não há relatos, se estas proteínas desnaturadas poderiam também sensibilizar um indivíduo atópico (MACHADO E SILVA, 1992; SILVA JR. *et al.*, 1996; VIEIRA, 2002).

A alergia desencadeada pelas albuminas 2S de mamona é causada por inalação da poeira da torta e grãos de pólen dispersos no ar ou também por contato com a torta residual, dessa forma, as pessoas que trabalham extraíndo o óleo das sementes ou manuseando a torta e, os moradores próximos a área de plantio são expostos a esses alérgenos (GARCIA-GONZALEZ, *et al.*, 1999). As doenças alérgicas representam um grande problema, e durante muitos anos a sensibilização aos pólenes constitui a forma predominante de diversos casos de alergia (WOODFOLK *et al.*, 2015). Atualmente a alergia é uma doença que afeta cerca de 25% da população, e os casos de alergia ao pólen são cada vez mais frequentes (LUCAE *et al.*, 2015).

Os indivíduos predispostos geneticamente a desenvolverem a alergia, podem ser sensibilizados após o contato ou inalação do alérgeno. Sabe-se que a sensibilização a alérgenos presentes em pólenes pode ocorrer de forma isolada ou associada à sensibilização a outros alérgenos, como os alérgenos de ácaros da



poeira domiciliar, fungos e pele de animais (POULSEN E HUMMELSHOJ, 2007; VIEIRA, 2003). Diversos estudos demonstraram que alérgenos de diferentes fontes são reconhecidos pelo mesmo anticorpo IgE, devido a reação cruzada entre esses alérgenos. Anticorpos IgE produzidos contra alérgenos Bet v 1 presentes no pólen de bétula, por exemplo, também reconhecem alérgenos semelhantes àqueles encontrados nessa planta, tais como avelã, carpa e carvalho (NIEDERBERGER, 2008; SÁNCHEZ-MONGE E SALCEDO, 2005; AALBERSE, 2000

A similaridade entre as proteínas tanto de origem vegetal como animal, é um fator que explica a importância da IgE nas reações cruzadas pois, quando um indivíduo é sensibilizado a uma determinada proteína pode ser induzido a reações alérgicas quando houver exposição a outras proteínas semelhantes, não necessariamente sendo o mesmo alérgeno. Essa reação cruzada entre as proteínas pode ocorrer devido a existência de uma sequência idêntica de aminoácidos, no entanto, esse não é o único fator para a ocorrência de reação alérgica cruzada. A afinidade desta sequência à IgE, sua estrutura espacial e o grau de homogeneidade (de 25% a mais de 70% de similaridade) são fatores determinantes para que haja o reconhecimento das proteínas pelo sistema imunológico (SÁNCHEZ-MONGE E SALCEDO, 2005; AALBERSE, 2000).

#### **1.4 – Hipersensibilidade**

O termo hipersensibilidade é usado para referir-se a uma resposta imune que resulta em reações excessivas e indesejáveis, e podem causar danos ao organismo. Essas reações ocorrem a partir de um estímulo gerado pelo contato com antígenos ambientais que são reconhecidos e distinguidos pelo sistema imune. Os antígenos ambientais que causam essas reações são chamados de alérgenos e induzem ao estado de hipersensibilidade ou alergia (PARHAN, 2011; JANEWAY, 2001).

As manifestações clínicas variam de acordo com o indivíduo e normalmente ocorrem após o seu contato com o antígeno específico contra o qual é sensível. De forma geral, as reações sintomáticas da hipersensibilidade são aumentadas dependendo do grau de exposição ao antígeno ou alérgeno. O primeiro contato do indivíduo com o alérgeno torna-o sensível ao induzir a produção de anticorpos e a partir dos contatos seguintes provocam uma resposta alérgica (LENVINSON, 2014; JANEWAY, 2001). Gell e Combs classificam as reações de hipersensibilidade em

quatro tipos (apud RAJAN, 2003) de acordo com os seus mecanismos efetores, dentre as quais, os tipos I, II e III são mediados por anticorpos, sendo as reações do tipo I mediadas por IgE, enquanto as do tipo II e III são mediadas por IgG. Já a hipersensibilidade do tipo IV é mediada por células T efectoras específicas para o antígeno pelo qual estas células foram sensibilizadas (LENVINSON, 2014; RAJAN, 2003).

A hipersensibilidade do tipo I é resultante da ligação do antígeno solúvel a uma IgE específica ligada ao seu receptor Fc, principalmente fixada nos mastócitos, desencadeando a sensibilização do indivíduo. A interação formada pela ligação cruzada de várias moléculas de IgE e o alérgeno dispara a desgranulação dos mastócitos e, conseqüente liberação de seus mediadores inflamatórios. Geralmente as reações do tipo I são causadas pela inalação de partículas antigênicas, como por exemplo, o pólen de plantas. Essas reações têm efeitos variados sobre o organismo, podendo causar desde uma coriza a sérias complicações respiratórias, e até mesmo morte por asfixia. As reações de hipersensibilidade do tipo I são descritas como imediatas porque ocorrem logo após a exposição ao antígeno (PARHAN, 2011; MURRAY *et al.*, 2015).

As reações citotóxicas que envolvem os anticorpos IgG que se ligam ao antígeno na superfície celular, são chamadas reações do tipo II, essas reações são causadas por pequenas moléculas que se ligam aos componentes da superfície celular modificando-as e, dessa forma, estas células serão reconhecidas com estranhas pelo sistema imune. Os anticorpos IgG ao se ligarem às células modificadas causam sua destruição por meio de ativação do complemento e fagocitose (PARHAN, 2011).

A reações de hipersensibilidade do tipo III ocorrem devido a formação de complexos imunes formados por antígenos proteicos ligados à IgG produzido contra eles. Os imunocomplexos formados por antígeno-anticorpo são depositados nos tecidos, provocando uma resposta inflamatória através da ativação do sistema complemento que atrai as células polimorfonucleares para o local, as quais liberam enzimas lisossomais causando danos ao tecido (LEVINSON, 2014; PARHAN, 2011).

Finalmente, a hipersensibilidade do tipo IV é descrita como hipersensibilidade do tipo tardia, pois pode se manifestar dias após o contato com o antígeno. Esse tipo de reação ocorre quando o antígeno é apresentado as células T auxiliares, as quais

são sensibilizadas e se movem para o local da inflamação. Dessa forma, ao entrarem em contato novamente com o mesmo antígeno, estas células liberam linfocinas, as quais por sua vez induzem a inflamação e ativam macrófagos liberando diversos mediadores (MURRAY *et al.*, 2015; LENVINSON, 2014).

#### **1.4 – Mecanismos da Alergia**

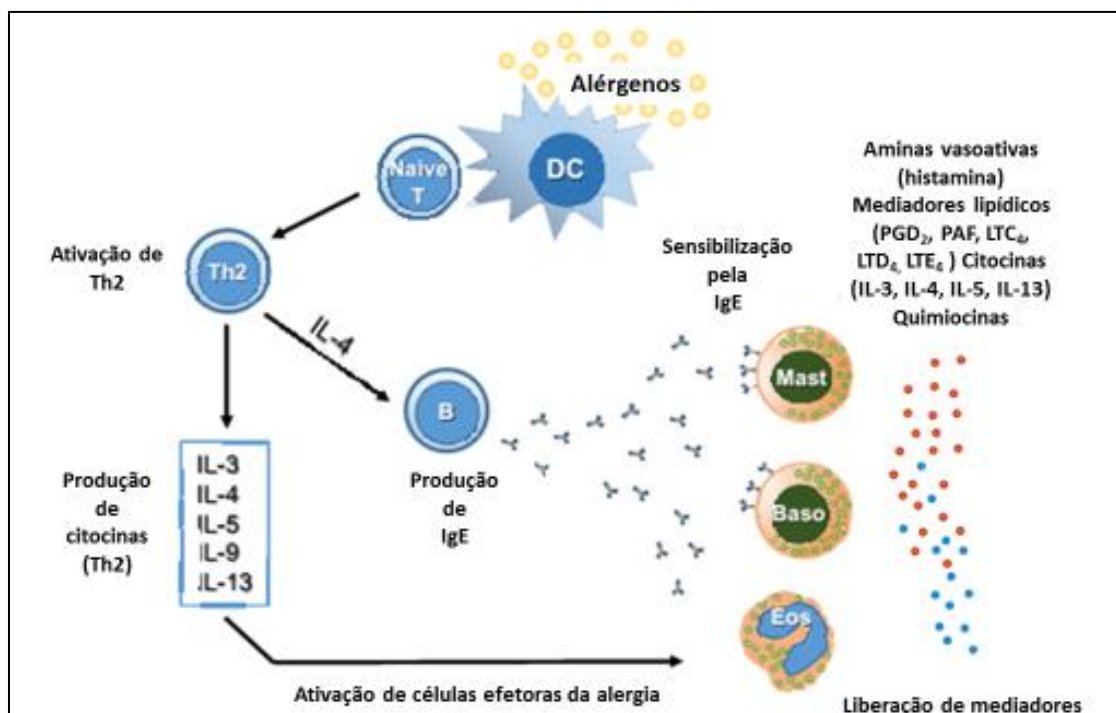
O termo alergia ou hipersensibilidade do tipo I (imediate) refere-se a reações mediadas por anticorpos IgE. Em indivíduos sensibilizados as moléculas de IgE específicas desempenham um papel crucial nas reações alérgicas. O organismo pode receber o alérgeno através da inalação, ingestão ou contato com a pele. A sensibilização alérgica é iniciada quando o alérgeno é internalizado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Este alérgeno sofre uma clivagem proteolítica e, os fragmentos peptídicos gerados, são expostos na superfície da APC associada com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II (MHC II). Os peptídeos do alérgeno processado, então, são apresentados às células T não primadas, as quais, por sua vez, são diferenciadas em células Th2 (HOLM *et al.*, 2011).

A secreção de citocinas pelos linfócitos T auxiliares determina o padrão de resposta Th2. As células Th2 ativadas induzem, através de citocinas, a produção de anticorpos pelos linfócitos B, iniciando uma resposta imunológica (HOLM *et al.*, 2011; ABBAS, 2003). As citocinas produzidas pelas células Th2 são responsáveis por muitas características da hipersensibilidade imediata. A alta produção, principalmente, de interleucinas 4 (IL-4) induz a troca de classe nos linfócitos B para produzirem IgE. Os anticorpos IgE, então, são liberados pelos plasmócitos, e se associam aos receptores específicos (FcεRI) presentes na superfície dos mastócitos encontrados no tecido, ou em basófilos circulantes no sangue. Assim, ocorre a primeira sensibilização (ABBAS, 2008; HOLGATE E POLOSA, 2008; LICHTENSTEIN, 1993).

Após uma nova exposição ao mesmo antígeno (segunda sensibilização), ocorrerá uma ligação cruzada entre segmentos específicos do antígeno (epitopos ligantes de IgE) com as moléculas de IgE previamente fixadas na superfície dos mastócitos e basófilos. A associação de um alérgeno a um anticorpo IgE é específica, ou seja, o anticorpo reconhece a região presente no alérgeno, chamada

epitopo de ligação a IgE. Dessa forma, pode haver reação cruzada desencadeando vários casos de hipersensibilidade imediata, devido a alguns alérgenos possuírem determinantes antigênicos (epitopos) semelhantes (FELIX, 2006; BUFE, 2001).

Depois da ligação cruzada, os mensageiros intracelulares são ativados induzindo a desgranulação dos mastócitos, provocando a liberação de quimioatrativos (citocinas, leucotrienos) para os eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares, ativadores (histamina, fator ativador de plaqueta, triptase, cinogenase) que promovem a vasodilatação e o edema; e espasmógenos (histamina, prostaglandina D12, leucotrienos) que são responsáveis por muitos sintomas alérgicos da hipersensibilidade imediata (alergia), como mostrado na figura 3, abaixo.



**Figura 3** - Mecanismos da resposta alérgica. O alérgeno é apresentado pelas células dendríticas (DC) a células T não primadas ou “naive” precursoras que se diferenciam para o fenótipo, e as células Th2 são induzidas devido à presença de IL-4. Estas células produzem citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, as quais são designadas como citocinas do padrão de resposta Th2. Os linfócitos B são induzidos a trocarem de classe e produzirem IgE, que se ligam aos receptores específicos (FcεRI) presentes na superfície dos mastócitos (Mast) e basófilos (Baso) na primeira fase, chamada sensibilização. Numa segunda exposição ao mesmo alérgeno, ocorre a desgranulação de mastócitos e basófilos que conduz a hipersensibilidade imediata (adaptado de OZDEMIR *et al.*, 2016).

Alguns casos mais graves de alergia resultam em anafilaxia, podendo levar ao óbito (HOLM *et al.*, 2011; ABBAS, 2008; LICHTENSTEIN, 1993). A resposta alérgica em humanos depende de vários fatores, como por exemplo, a tendência genética ou atopia para desenvolver a alergia. Além disso, outros fatores importantes para o desencadeamento de uma reação alérgica são a dose alergênica, o tipo e a via de exposição ao alérgeno. O reconhecimento antigênico é crucial para o desenvolvimento de uma resposta alérgica demonstrando a importância da interação entre os fatores genéticos e exposição ao alérgeno (SIMPSON E CUSTOVIC, 2005).

### **1.5 – Epitopos ligantes de IgE**

A interação entre o alérgeno e o anticorpo IgE é específica e ocorre através da região presente no alérgeno chamada epitopo ou determinante antigênico. Os epitopos podem ser compostos por resíduos de aminoácidos sequenciais ao longo da cadeia polipeptídica (epitopos contínuos ou lineares), ou podem ser formados por resíduos não sequenciais presentes em segmentos da cadeia unidos quando a proteína estabelece sua conformação enovelada (epitopos conformacionais ou descontínuos), resultante do seu arranjo estrutural (WOLFF *et al.*, 2003).

Com relação ao estudo dos epitopos presentes nas albuminas 2S de mamona realizados pelo nosso grupo, Vieira em 2002 observou que ambas as isoformas isoladas do “pool” de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, mesmo após serem submetidas à desnaturação, são capazes de desencadear a desgranulação de mastócitos, indicando a presença de epitopos contínuos nas duas isoformas. Em 2004, Mayerhoffer caracterizou um epitopo contínuo da cadeia pesada de Ric c 1 das albuminas 2S de *Ricinus Communis*. Felix e colaboradores em 2008 identificaram seis epitopos alergênicos, dois em Ric c 1 e quatro em Ric c 3 (Figura 4). Nesses epitopos foi observada a presença de pelo menos dois resíduos de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico) a uma distância de no máximo 12 resíduos (FELIX, 2007). Esta distância é fundamental para que haja a ligação às IgEs presentes na membrana dos mastócitos e/ou basófilos e desencadearem o processo de desgranulação destas células, provocando a liberação de mediadores, como a histamina, que levam aos sintomas da alergia. (DEUS-DE-OLIVEIRA, 2013).

### Ric c 1

Cadeia leve:

1        10        20        30  
 PSQQGCRGQIQEQQNL~~RCQ~~EYIKQQVSGQGPRR  
**P3 (Epitopo 1)**

Cadeia pesada:

1        10        20        30        40        50        60  
 QERSLRGCCDHLKQM~~QSQRC~~EGLRQAIEQQQSQGQLQGQDVFEAFRTAANLPSMCGVSPTECRF  
**P0 (Epitopo 2)**

### Ric c 3

Cadeia leve:

1        10        20        30        40  
 ESKGEREGSSSQ~~CRQ~~EVQRKDLSSCERYLRQSSRRSPGE  
**P1 (Epitopo 3)**        **P2 (Epitopo 4)**

Cadeia pesada:

1        10        20        30        40        50        60  
 QQQESQQLQQCCNQVKQVR~~DECQCE~~AIKYIAEDQIQGGQLHGEESE~~VAQRAGE~~IVSSCGVRCMRQT  
**P4 (Epitopo 5)**        **P5 (Epitopo 6)**

**Figura 4** - Estrutura primária das isoformas de albuminas 2S de *R. communis*, Ric c 1 e Ric c 3, destacando as cadeias leve e pesada e os seis epitopos alergênicos (FELIX *et al.*, 2008).

Posteriormente, Carriello-Gama (2006) tratou os seis epitopos ligantes de IgE previamente identificados em 2008 presentes nas isoformas, Ric c 1 e Ric c 3, com N-etil-5-fenilsoxazolium-3`-sulfonato (Woodward`s Reagent K -WRK). Este reagente é específico para alterar ácidos glutâmicos, assim o material modificado não era mais reconhecido pelos mastócitos sensibilizados com IgE anti-albuminas 2S de mamona e, portanto, não sendo capaz de deflagrar a reação alérgica. Dessa forma, evidenciou-se, a importância da participação do ácido glutâmico para promover a ligação cruzada entre os alérgenos de mamona e as IgEs (CARRIELO-GAMA, 2006; FELIX, 2006).

Sabe-se que as albuminas 2S de mamona apresentam similaridades estruturais com outras fontes de alérgenos aéreos ou alimentícios. Esses epitopos podem estar relacionados com a reação cruzada entre alguns tipos de alérgenos como descrito por Valenta *et al.* (1996) e Deus-de-Oliveira *et al.* (2011). Dessa forma, é importante identificar a estrutura dos epitopos ligantes de IgE para o desenvolvimento de novas estratégias que possibilitem um diagnóstico preciso da doença alérgica, bem como um tratamento específico (MATSUO *et al.*, 2015).

Ensaio *in vitro*, realizados por Deus-de-Oliveira *et al.* (2011), demonstraram que soros contendo IgE anti-albumina 2S de mamona quando previamente tratados com ácido glutâmico livres e, em seguida, incubados com mastócito e, posteriormente, desafiados com alérgenos de mamona não desencadeiam processos de desgranulação, indicando que estes ácidos glutâmicos livres possam atuar como bloqueadores desta imunoglobulina (FELIX *et al.*, 2008, DEUS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A hipótese é que o ácido glutâmico se ligue à IgE e ocupe o sítio de interação com o epitopo, impedindo a ligação cruzada com o alérgeno e, deflagração da alergia. Dessa forma, foi proposto a utilização do ácido glutâmico como agente bloqueador de IgE. Nos experimentos realizados por Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011 pode-se observar que o tratamento das IgEs com ácido glutâmico livre, além de impedir a ligação de IgE entre alérgenos de mamona, também impediu a resposta cruzada com alérgenos de diversas fontes alimentares como aqueles presentes no peixe, camarão e milho, bem como a alérgenos inalantes presentes na poeira e no tabaco (DEUS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2011). Embora os resultados obtidos sejam promissores quanto aos dados *in vitro*, muitos estudos ainda precisam ser realizados

a fim de utilizar o ácido glutâmico como terapia bloqueadora de IgE *in vivo* para tratamento de doenças alérgicas considerando as diversas funções desempenhadas por este aminoácido para o organismo.

### **1.6 – O ácido glutâmico e sua função neurológica**

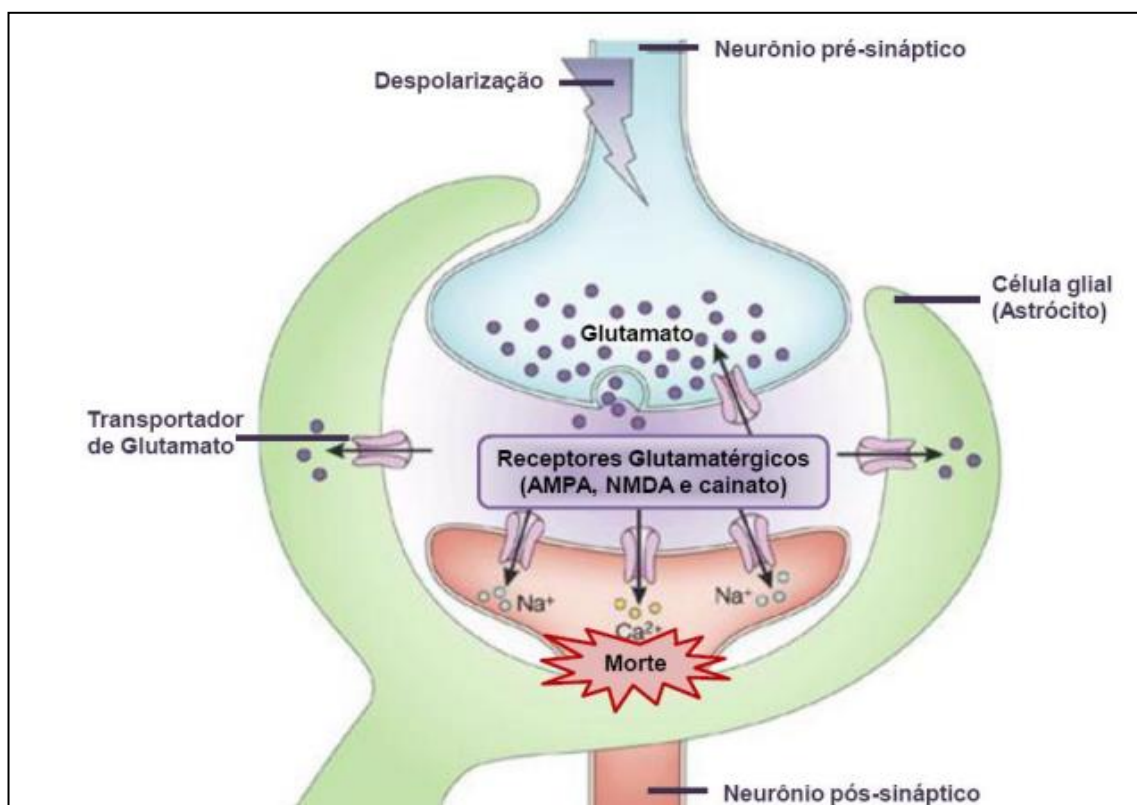
O ácido glutâmico ou glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC) e está envolvido em diversas funções como cognição, memória e aprendizado. Este aminoácido desempenha papéis relevantes no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, na epilepsia, na isquemia neural, na tolerância e na dependência a drogas, na dor neuropática, na ansiedade e na depressão (YERNOOL *et al.*, 2004).

A síntese do glutamato ocorre a partir de glutamina, através da enzima glutaminase, e também pode ser sintetizado a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs, através da enzima GABA transaminase, que o converte em glutamato. Esse aminoácido encontra-se amplamente distribuído no cérebro e demais regiões do SNC, sendo armazenado em vesículas sinápticas. O glutamato pode se ligar a dois grupos de receptores glutamatérgicos: os ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs podem ser de três tipos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA) (GOODMAN E GILMAN, 1996). Os receptores ionotrópicos (iGluR), apresentam ação rápida, pois afeta diretamente o fluxo de íons (principalmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ), gerando modificações no estado eletroquímico da membrana pós-sináptica. Enquanto os receptores metabotrópicos (mGluRs), precisam estar acoplados a proteína G e participam dos mecanismos de resposta intracelular através da ativação de segundos mensageiros. O efeito de excitação ou inibição induzido por essa forma de recepção indireta dos neurotransmissores gera um potencial resultante mais lento e de maior duração (JAYANARAYANAN *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2011).

A estimulação excessiva dos receptores de glutamato pode causar efeitos neurotóxicos, ou seja, o estímulo conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica pode gerar a morte neuronal (Figura 5). Além disso, o estímulo excessivo dos receptores de glutamato podem provocar danos neuronais, como por exemplo, as complicações diabéticas denominadas retinopatia e neuropatia (JAYANARAYANAN



*et al.*, 2013; DELYFER *et al.*, 2005; GILL E PULIDO, 2001). Alguns estudos sugerem que as concentrações extracelulares de glutamato podem variar de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , entretanto, tais concentrações não refletem a quantidade real de glutamato na fenda sináptica, considerando que concentrações com poucos micromolares ativariam significativamente e/ou dessensibilizariam seus receptores (BUTCHER, *et al.*, 1987; MORALES-VILLAGRAN; TAPIA, 1996).



**Figura 5** - Morte neuronal por excitotoxicidade glutamatergica. O glutamato é liberado na fenda sináptica por despolarização após um potencial de ação. Os níveis deste neurotransmissor são cuidadosamente controlados por transportadores astrocitários que o captam, reduzindo seus efeitos pós-sinápticos. No entanto, muitas condições deletérias podem convergir para a excitotoxicidade desenfreada de glutamato iniciando uma cascata de eventos que leva à excitotoxicidade. O influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular através da ativação exacerbada de receptores glutamatergicos ionotrópicos AMPA, NMDA e cainato ativa vias de sinalização que culminam na morte celular. (Adaptado de SYNTICHAKI E TAVERNARAKIS, 2003).

O ácido glutâmico é muito utilizado, principalmente, na culinária chinesa como um intensificador de sabor, mas também é encontrado na forma de glutamato monossódico, em diversos alimentos tais como, sopas enlatadas, biscoitos, carnes, saladas e refeições congeladas (JINAP E HAJEB, 2010). Em 1959, a FDA (Food and Drug Administration, ou Agência Norte-Americana de Controle de Alimentos e Medicamentos), classificou o glutamato monossódico como “seguro”, porém muitos sintomas causados pelo seu consumo foram relatados ao FDA ao longo dos anos (BBC, 2015; HE et al., 2008; FDA, 2006).

Estudos demonstram que o glutamato monossódico pode ser classificado como uma excitotoxina, ou seja, uma substância que estimula as células podendo danificá-las ou causar a morte. Nesse sentido, os riscos à saúde associados ao uso do glutamato na alimentação, ocorrem porque este aminoácido é o principal neurotransmissor estimulante do sistema nervoso central e, portanto os danos nas células cerebrais podem conduzir a diversos efeitos colaterais como, dores de cabeça, aceleração dos batimentos cardíacos, dores no peito, dormência no rosto e pescoço, palpitações e sudorese e, além disso pode desencadear outras complicações, como por exemplo, dificuldades de aprendizado, Alzheimer e Doença de Parkinson. O glutamato usado para intensificar o sabor dos alimentos, também pode estar relacionado ao desenvolvimento de doenças crônicas como obesidade, diabetes, transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, autismo, epilepsia, além de ser genotóxico a vários órgãos (HE et al., 2008, ERB, 2006).

De acordo com os relatos presentes na literatura e diante das diversas funções importantes desempenhadas pelo ácido glutâmico, a sua utilização *in vivo* para bloqueio de IgE, como abordagem terapêutica para o tratamento da alergia, apresenta grandes dificuldades devido a possibilidade desse aminoácido desencadear diversos efeitos colaterais no organismo.

### **1.7 - Estratégias terapêuticas para o tratamento da alergia**

Com o aumento da ocorrência de doenças alérgicas, alternativas têm sido estudadas para o tratamento da alergia, visando amenizar os sintomas desencadeados pelas respostas do organismo frente aos alérgenos e reduzir o uso de farmacoterápicos. As terapias farmacológicas existentes são utilizadas para aliviar os sintomas da alergia, ou seja, são baseadas nas consequências da

hipersensibilidade imediata. Como estratégia inicial utiliza-se agentes farmacológicos anti-histamínicos, que tipicamente se ligam aos receptores da histamina e inibem seus efeitos. Embora este tratamento seja eficaz em controlar os sintomas da alergia, pode causar efeitos colaterais sedativos, causando sonolência e, não tratam a causa deflagradora dos mesmos (HOLGATE; POLOSA, 2008; GUEDES *et al.*, 2007).

Além da terapia descrita existem também os tratamentos que exercem ação preventiva que limitam o início das reações alérgicas, como é o caso da imunoterapia com extratos de alérgenos. A imunoterapia com alérgenos consiste na administração de quantidades pequenas, progressivamente crescentes de um ou poucos alérgenos ao longo do tempo, com o objetivo de promover a dessensibilização (TONNEL, 2005).

A terapia alérgeno-específica inclui as imunoterapias oral, sublingual e subcutânea. Os mecanismos de ação da imunoterapia alérgeno-específica (ASIT) incluem os efeitos precoces no processo de dessensibilização do organismo, primeiro ocorre a modulação das respostas de células T e B e alteração dos isotipos de anticorpos relacionados. A ASIT induz o aumento de anticorpos IgG4, os quais são capazes de capturar o alérgeno antes que ele se ligue a IgE específica e, portanto, previne a ativação de mastócitos e basófilos (AKDIS E AKDIS, 2011).

A ASIT também pode induzir a tolerância imunológica através de repetidas exposições ao alérgeno e diminuir o nível de anticorpos IgE específicos, porém a sua eficácia é muito limitada, pois é direcionada apenas para um determinado alérgeno (HOLGATE; POLOSA, 2008; NOWAK-WE; SAMPSON, 2013; SILVA, 2008). Outra estratégia que vem sendo abordada é a imunoterapia cruzada utilizando pólen para tratamento da chamada síndrome de alergia pólen-alimentar (PFAS, também referido como Síndrome da Alergia oral). Foi demonstrado efeitos positivos sobre os sintomas orais e em teste cutâneo para certos alimentos de origem vegetal em indivíduos tratados com pólen por imunoterapia subcutânea ou sublingual (NOWAK-WE; SAMPSON, 2013). Existem ainda algumas terapias não específicas, que utilizam anticorpos monoclonais capazes de bloquear a IgE e alterar as respostas imunes, prevenindo os sintomas da alergia (NOWAK-WE; SAMPSON, 2013).

Uma abordagem imunoterapêutica alternativa, por bloqueio da região de interação do alérgeno com a IgE, está sendo proposta neste trabalho. Esta nova abordagem é baseada em experimentos que mostram que o ácido glutâmico livre é capaz de se ligar a IgE, específica para alérgenos de mamona, ocupando o sítio de interação do epítipo impedindo a ligação dos alérgenos, em uma segunda exposição, às IgEs fixadas nos mastócitos. (DEUS-DE-OLIVEIRA, 2011). Por outro lado, o ácido glutâmico atua como neurotransmissor excitatório, assim utilizar este aminoácido livre, *in vivo*, como agente terapêutico para bloquear a molécula de IgE, poderia provocar alterações nos impulsos nervosos no organismo humano. Uma alternativa para isso seria a utilização de derivados do ácido glutâmico, apresentando modificações em suas cadeias laterais. Esses compostos modificados podem ser uma alternativa segura para bloqueio dos sítios de interação da molécula de IgE com alérgenos da mamona e similares.

Dessa forma, como exposto anteriormente que ocorrem respostas cruzadas da IgE específica de albumina 2S de mamona com proteínas alergênicas presentes em algumas fontes alimentares, acreditamos que o tratamento alternativo a ser testado (bloqueio da IgE), baseado no conhecimento de epítopos de IgE dos principais alérgenos de mamona, Ric c 1 e Ric c 3, possa ser extrapolado para tratamento de outras alergias desencadeadas contra substâncias de contato frequente, tanto no meio rural quanto urbano.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

Avaliar o bloqueio da molécula de IgE pela ação de ácidos glutâmicos modificados como terapia alternativa para tratamento da alergia.

### 2.2 - Objetivos Específicos

- Sensibilizar camundongos com diferentes concentrações de albumina 2S de sementes de mamona;
- Avaliar a resposta imunológica nos camundongos após as imunizações com albumina 2S de mamona;
- Obter soro rico em IgE específica anti-albumina 2S de mamona nos camundongos imunizados;
- Realizar ensaios de bloqueio da IgE anti-albumina 2S *in vitro* utilizando cinco ácidos glutâmicos modificados: D- ácido glutâmico; N-metil-L-ácido glutâmico; N-acetil-L- ácido glutâmico; N-(4-nitrobenzoi)-L- ácido glutâmico e N-carbamil-L- ácido glutâmico.
- Comparar a eficácia da ação bloqueadora da IgE realizada por cada um dos ácidos glutâmicos modificados em ensaios *in vitro*.
- Estabelecer a relação existente entre a concentração do agente bloqueador e as IgE *in vitro*;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

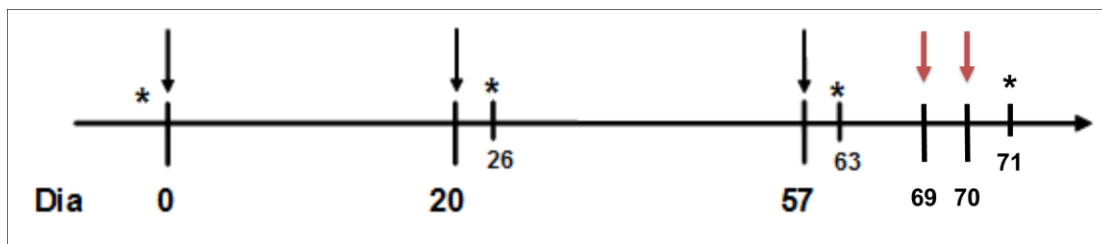
#### 3.1 - Obtenção das albuminas 2S

As albuminas 2S foram isoladas das sementes de *Ricinus communis*, cultivar IAC226, já disponíveis no laboratório, as quais foram extraídas pela metodologia descrita por Thorpe e colaboradores em 1988, segundo as adaptações propostas por Marcondes de Souza em 1997.

#### 3.2 - Protocolos de imunizações

As etapas de imunizações foram realizadas em colaboração com a professora Dra. Elena Lassunskaia do Laboratório de Biologia do Reconhecer da UENF, seguindo metodologia descrita por Deus-de-Oliveira em 2013. Foi utilizado o modelo animal, Balb/c (n= 6 fêmeas de 5 a 6 semanas/grupo). Considerando que a escolha da linhagem para estudos com sensibilização a um alérgeno é importante, estes testes foram realizados com camundongos do tipo BALB/c, linhagem mais utilizada em estudos de asma e, também bons produtores de anticorpos IgE contra ovalbumina (OVA). Os camundongos BALB/c também são descritos como produtores de maiores concentrações de citocinas do padrão Th2 (IL-4 e IL-5) no lavado broncoalveolar, quando comparados, por exemplo, com animais da linhagem C57BL/6 (KUMAR *et al.*, 2008).

Dois diferentes protocolos de imunização pela via intraperitoneal (IP) foram utilizados, o primeiro protocolo determina a inoculação nos animais de 1 µg do alérgeno purificado, já o outro protocolo prevê a sensibilização com 10 µg do alérgeno, ambos na presença de adjuvante. Os camundongos foram divididos em dois grupos (n= 6 animais/grupo) para a realização dos dois protocolos previstos. O primeiro grupo (G1P1) foi imunizado com 1 µg de albuminas 2S de mamona na presença de 4 mg de hidróxido de alumínio/inoculação. No segundo protocolo de imunização os camundongos (G2P2) receberam 10 µg do alérgeno de mamona na presença de 5 mg de hidróxido de alumínio como adjuvante. Em ambos os protocolos seguimos o mesmo cronograma, realizando três imunizações de acordo com os intervalos apresentados na figura 6.



**Figura 6** - Cronograma do protocolo experimental de imunização. As setas representam as imunizações, sendo que as setas em vermelho representam as doses reforço e, os asteriscos as coletas de sangue (DEUS-DE-OLIVEIRA, 2013).

Ao final da terceira imunização (dia 57), os dois grupos de camundongos receberam doses de alérgeno como reforço. Este reforço foi realizado 12 dias após esta 3ª imunização, da seguinte forma, os animais foram imunizados durante dois dias seguidos e no terceiro dia o sangue foi coletado. Nessa etapa de reforço utilizamos, em ambos os grupos, 10 µg de albumina 2S de mamona sem a presença de adjuvante.

Nos protocolos de imunização propostos nesse trabalho as amostras de sangue foram coletadas por sangria pelo plexo retro-orbital de cada animal antes da primeira imunização (pré-imune) e, após imunizações de acordo com cada protocolo empregado (Figura 6). Os soros provenientes de cada animal foram obtidos após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C e, posteriormente guardados a -20 °C para testes quanto a resposta humoral dos animais imunizados. Após o período previsto de cada protocolo experimental os animais foram sacrificados em câmara de gás (CO<sub>2</sub>) e, posteriormente, descartados, segundo procedimentos recomendados pela CEUA/UENF (Comissão de Ética de Uso Animal/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro).

### **3.2.1 – Avaliação da resposta imunológica dos camundongos:**

Para avaliarmos a resposta humoral inicial dos camundongos imunizados verificamos nos soros coletados a dosagem do título de IgG anti-albumina 2S de mamona por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A dosagem desta imunoglobulina especificamente foi utilizada para demonstrar se os animais utilizados nas etapas de imunização foram ou não estimulados para a produção de anticorpos específicos ao longo do experimento. Nos ensaios de ELISA utilizamos

controles, tais como o branco da amostra (Br1= proteína+revelação) para verificarmos se a própria amostra possui atividade peroxidásica intrínseca e, o branco do tampão (Br2= tampão carbonato/bicarbonato+anticorpos+revelação) para avaliarmos a pureza do tampão que as amostras são diluídas.

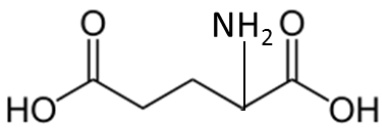
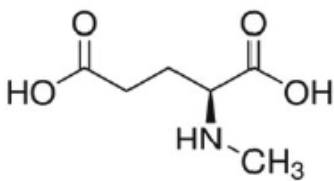
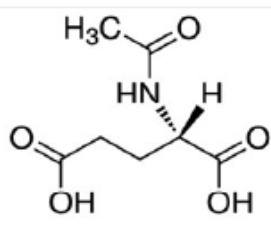
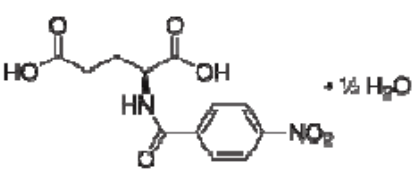
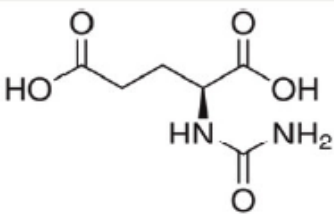
As etapas gerais para realização do ELISA foram: sensibilização da microplaca (Nunc MaxiSorp®) com 1µg/100 uL da amostra (albumina 2S purificada de sementes de mamona) por 18 horas, a 4°C. Após esse tempo, a placa foi lavada duas vezes com PBS (tampão Fosfato de sódio Salino) contendo 0,05% de Tween 20 (300 µL/poço durante 1 hora). Em seguida, foram adicionados 300 uL de tampão bloqueador (gelatina 1% em PBS contendo Tween 20), permanecendo na placa por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse tempo de bloqueio, a placa foi novamente lavada com PBS contendo Tween 0,05% (300 µL/poço durante 1 hora), e foi adicionado 50 µL/poço do anticorpo primário (soro obtido dos camundongos) durante duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi novamente lavada com PBS contendo Tween, por três vezes de 5 minutos e, em seguida, foi incubada com o anticorpo secundário, por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada com PBS contendo Tween, por três vezes de 5 minutos. A revelação foi feita com 50 µL da solução de revelação (10 mg de OPD (O-Ortofenilediamina); 10uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) 30%; 6,5 mL de ácido cítrico 0,1 M; 7,0 mL de fosfato de sódio 0,2 M e 9,0 mL de H<sub>2</sub>O (água) destilada). A reação foi interrompida adicionando 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) por poço. A leitura da microplaca (Thermo Plate-TP Reader) foi realizada a 492 nm. Posteriormente a pesquisa de IgG contra albumina 2S de mamona no soro dos camundongos, passamos para verificarmos o padrão de resposta humoral induzido por linfócito T auxiliares (helper), Th2. O soro dos animais imunizados com albumina 2S foram testados por ELISA para presença de imunoglobulinas características do padrão Th2 (IgG1 e IgE), utilizando como anticorpos secundários (anti-mouse), anti-IgG1 e anti-IgE,. Para acompanharmos a resposta imune induzida nos camundongos submetidos aos protocolos de imunização descritos (P1 e P2), realizamos ensaio imuno-enzimático com os soros de todos os animais.



### 3.3 –Ensaio de bloqueio de IgE com ácidos glutâmicos modificados

Para avaliar o bloqueio de IgE pelos ácidos glutâmicos modificados utilizamos a ensaio imuno-enzimático (ELISA). Para realização dos testes preliminares de bloqueio foram utilizadas soluções nas concentrações de 0,5  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$  de cada um dos aminoácidos livres descritos: ácido - L –glutâmico (E) e, os cinco ácidos glutâmicos modificados com suas estruturas apresentadas na tabela I, todos adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich.

**Tabela I:** Relação de ácidos glutâmicos modificados (Sigma-Aldrich) utilizados nos ensaios de bloqueio.

Ácidos glutâmicos Modificados	Sigla	Fórmula Estrutural	Massa Molecular
D- ácido glutâmico	E1		147.13
N-metil-L-ácido glutâmico	E2		161.16
N-acetil-L- ácido glutâmico	E3		189.17
N-(4-nitrobenzoyl)-L-ácido glutâmico Hemihidratado	E4		305.24
N-carbamil-L- ácido glutâmico	E5		190.15

Cada um dos aminoácidos a serem testados para os ensaios de bloqueio foi incubado na presença de soro obtido dos camundongos imunizados com albumina 2S de mamona. A diluição do soro foi ajustada para uma leitura de 0,5 de absorbância (Abs) a 492 nm. Em geral, a diluição do soro foi de 1:5 em tampão PBS (pH 7,2). O soro foi incubado com cada um dos aminoácidos, na proporção (1:10), sendo (aminoácido:soro), mantido sob agitação, à temperatura ambiente (~25° C) por 15 minutos. A etapa de sensibilização da microplaca foi feita com 100 µL de uma solução 0,2 µg/µL de albumina 2S de sementes de mamona, em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6). Em seguida, alíquotas de 50 µL dos soros previamente incubados com os aminoácidos candidatos a bloqueadores foram adicionados (anticorpo primário). A seguir empregamos as etapas gerais para ELISA descritas no item 3.2.1. A fim de avaliarmos o bloqueio da IgE pelos aminoácidos livres utilizamos como anticorpo secundário anti-IgE de camundongo HRP (1:2000), adquirido da Southern Biotech.

### **3.3.1 - Curva de concentração**

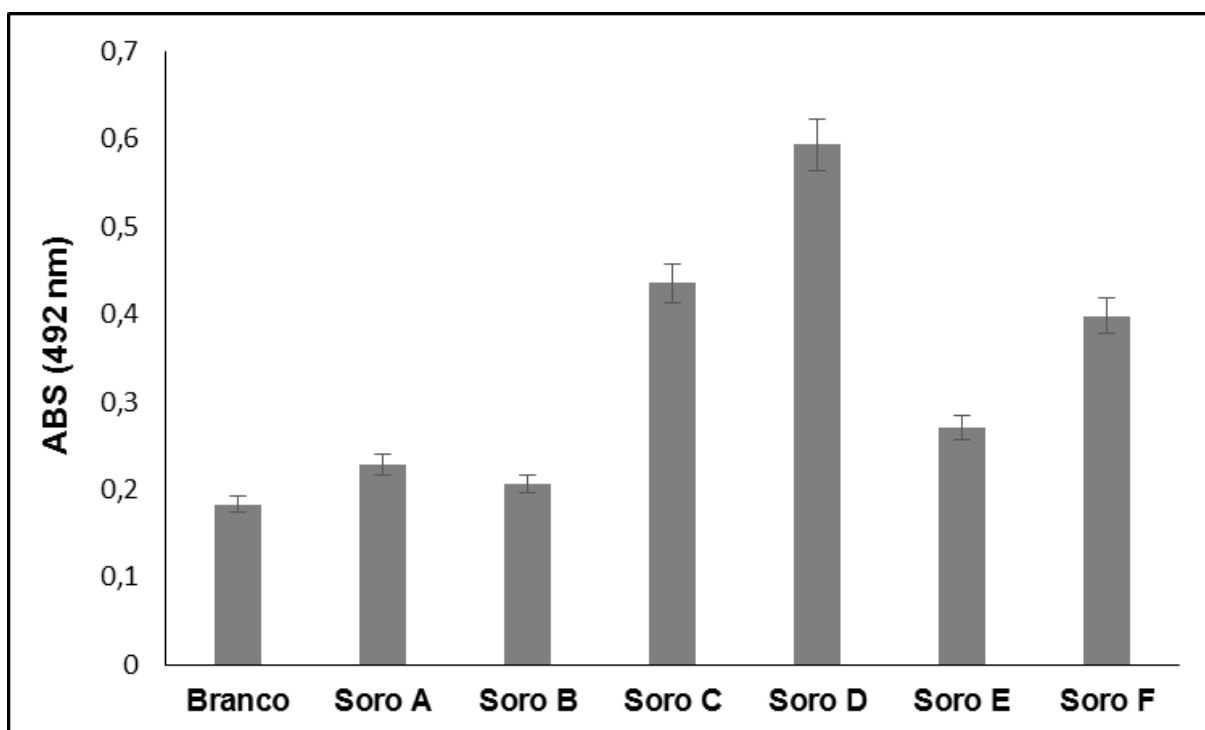
O agente bloqueador identificado com melhor desempenho nos ensaios preliminares foi submetido a curva de concentração para avaliarmos a relação entre a concentração do aminoácido e a efetividade do bloqueio da IgE. Para isso, foram utilizados ensaios de ELISA com volumes crescentes de 10 µL, 15 µL e 20 µL da solução do aminoácido selecionado na concentração de 0,5 µM/µL.

Para avaliarmos a concentração ideal para o bloqueio de IgE *in vitro*, utilizamos três diferentes concentrações de cada um dos aminoácidos descritos na Tabela I, utilizando volumes crescentes de 10 µL, 15 µL e 20 µL da solução dos aminoácidos. Dessa forma, podemos identificar a relação ideal entre a concentração de cada aminoácido e o bloqueio de IgE nos soros dos camundongos imunizados com albumina 2S de mamona. Nesses ensaios seguimos as mesmas etapas descritas no item 3.3 e empregamos as etapas gerais do ELISA conforme descrito no item 3.2.1.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 – Quantificação de IgE nos soros anti-albumina 2S de mamona produzidos em camundongos.

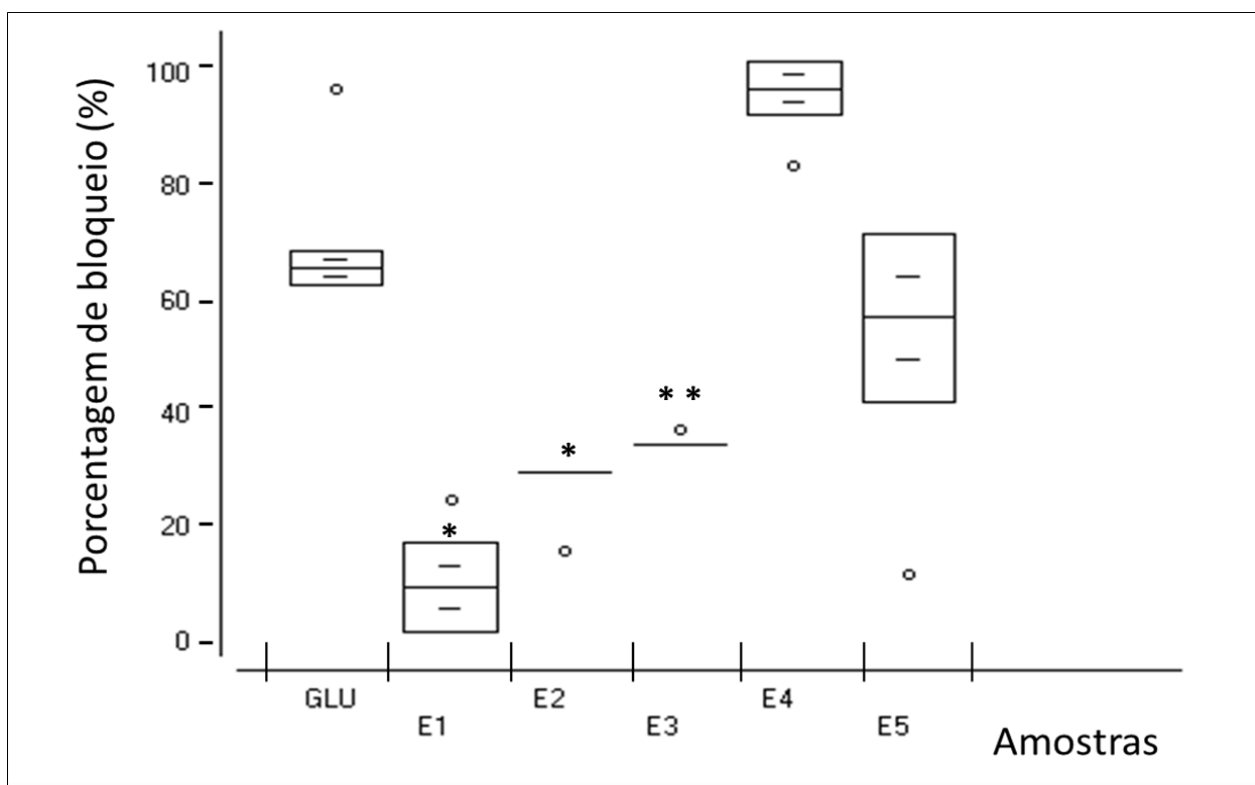
Para avaliarmos a presença de IgE específica anti-albumina 2S nos seis soros (A a F) de camundongos já disponíveis no laboratório, realizamos o ensaio ELISA, conforme descrito no item 3.2.1. Para normatização da titulação de IgE nos diversos ensaios de bloqueio, determinamos que as diluições dos soros deveriam ser ajustadas a fim de obtermos valores de absorbância entre 0,4 e 0,6. Na Figura 7 observamos os resultados obtidos deste ensaio mostrando que o soro policlonal que apresentou maior valor de absorbância (Abs > 0,5), para diluições 1:5, foi o soro D. Este soro, portanto, foi selecionado para ser utilizado nos ensaios de bloqueio com os ácidos glutâmicos modificados propostos neste trabalho.



**Figura 7** - Quantificação de IgE nos soros anti-albumina 2S de mamona produzidos em camundongos. Anticorpo primário: (Soro A): T3G1 - 13/09/12; (Soro B): T3G2 - 27/09/12; (Soro C) T3G3 - 11/10/12; (Soro D): "pool" (n=12); (Soro E): T3 - 25/11/12; (Soro F): T3 - 09/11/12. Anticorpo primário: soros (1:5). Anticorpo secundário anti-IgE de camundongo conjugado a HRP (1:2000).

#### 4.2 - Ensaios de bloqueio de IgE utilizando ácidos glutâmicos modificados

Para realizarmos ensaios preliminares de avaliação da ação bloqueadora de IgE pelos ácidos glutâmicos modificados, utilizamos o ensaio de ELISA. Para estes ensaios foram utilizadas soluções nas concentrações de  $0,5 \mu\text{M}/\mu\text{L}$  de cada um dos seis aminoácidos. O resultado é mostrado na figura 8. Como descrito no item 3.3 da metodologia, o soro D (1:5) foi previamente incubado, sob agitação, com cada um dos candidatos a agentes bloqueadores. A placa foi sensibilizada com a albumina 2S ( $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e, em seguida recebeu  $50 \mu\text{L}$  do anticorpo primário (soros bloqueados), seguido de adição do anticorpo secundário anti-IgE de camundongo HRP (1:2000).

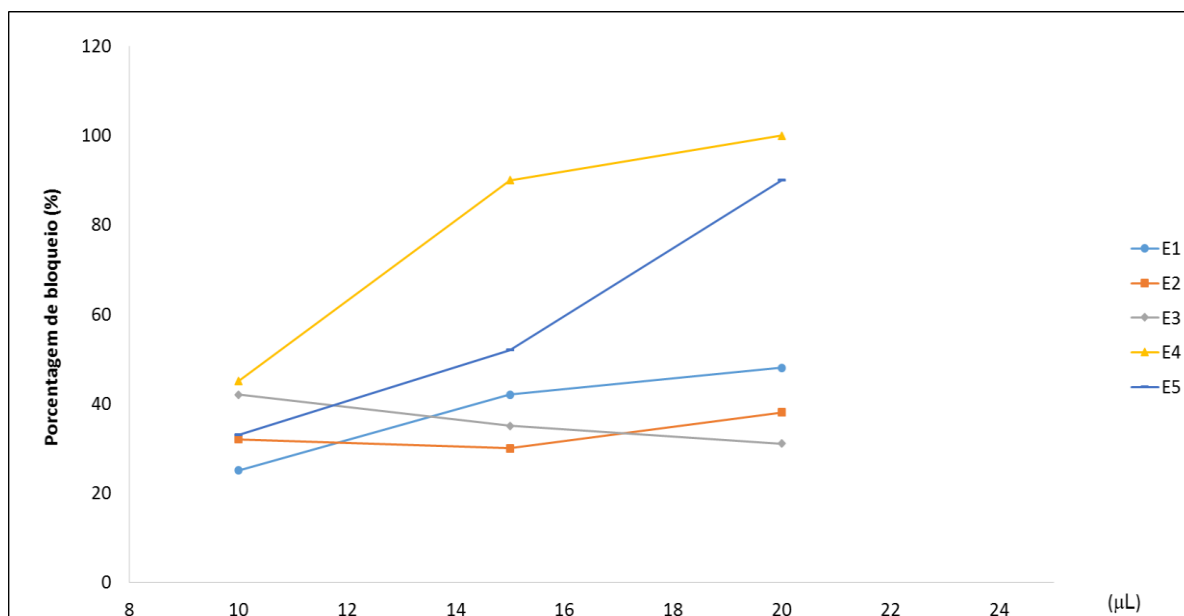


**Figura 8** - Ensaio imunoenzimático para avaliar o bloqueio de IgE pelos ácidos glutâmicos modificados. (Glu): Soro incubado com L-ácido glutâmico, (E1): Soro + D- ácido glutâmico. (E2): Soro + N-metil-L-ácido glutâmico. (E3): Soro + N-acetil-L-ácido glutâmico. (E4): Soro + N-(4-nitrobenzoi)-L- ácido glutâmico. (E5): Soro + N-carbamil-L- ácido glutâmico. Sensibilização da microplaca=  $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de albumina 2S de mamona; Anticorpo primário (soro) 1:5; Anticorpo secundário (anti-IgE de camundongo) 1:2000 ( $n=3$  média  $\pm$  D.P.; \*  $P<0,01$  e \*\*  $P<0,05$  em comparação com o ácido glutâmico (Glu), pelo one way ANOVA, teste de comparação múltipla de Tukey) Legenda = Box: linha central representa a média aritmética, sendo as linhas superior e inferior os  $\pm 1$  D.P.; Círculos: valores extremos *outliers*.

Na figura 8, observamos que entre os aminoácidos avaliados como possíveis bloqueadores, o D-glutâmico (E1) D- ácido glutâmico não foi reconhecido pela IgE anti-albuminas 2S, pois observamos 14% de bloqueio. Todos os outros aminoácidos mostraram-se bons candidatos a bloqueadores como pode ser observado nos resultados que mostram que o bloqueador (E2) N-metil-L-ácido glutâmico apresentou 25%, o (E3) N-acetil-L-ácido glutâmico 36%, o (E4) N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico 93% e o (E5) N-carbamil-L- ácido glutâmico 42% de bloqueio de IgE.

#### 4.2.1 – Eficácia comparativa da ação bloqueadora

Um estudo comparativo entre os cinco aminoácidos modificados foi realizado, usando um “pool do soro” de camundongos, anti-albuminas 2S, ricos em IgE, este soro D foi incubado com volumes crescentes (10  $\mu$ L, 15  $\mu$ L e 20  $\mu$ L) da solução de cada aminoácido na concentração de 0,5  $\mu$ M/ $\mu$ L. Nesse ensaio avaliamos a relação entre a eficácia de bloqueio e o volume utilizado. O resultado pode ser observado na figura 9.



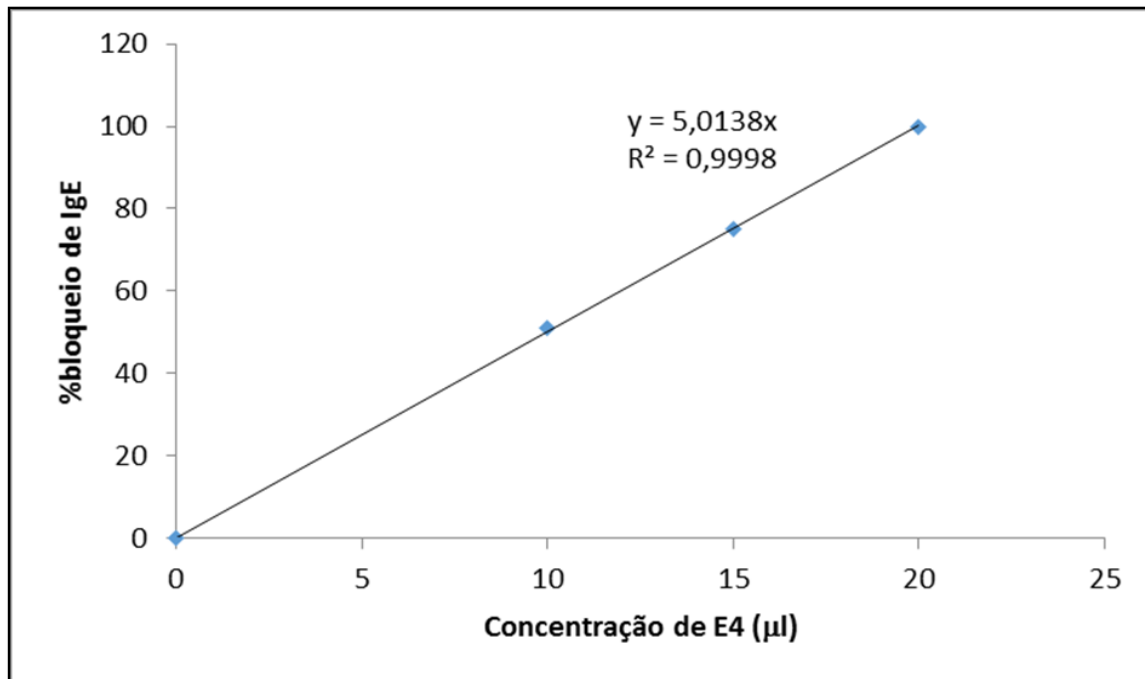
**Figura 9** - Relação entre a concentração dos cinco agentes bloqueadores e o bloqueio de IgE. (E1): Soro imune anti-albumina 2S de mamona (1:5) incubado com o ácido - D-glutâmico. (E2): Soro + ácido- N-metil-L- glutâmico. (E3): Soro + ácido - N-acetil-L- glutâmico. (E4): Soro + ácido - N-(4-nitrobenzoil)-L- glutâmico. (E5): Soro + ácido - N-carbamil-L- glutâmico, com volumes crescentes 10  $\mu$ L, 15  $\mu$ L e 20  $\mu$ L da solução de aminoácido 0,5  $\mu$ M/ $\mu$ L. Anticorpo primário: (1:5); anticorpo secundário (1:2000).

A figura 9 apresenta os resultados referentes a ação bloqueadora de cada um dos ácidos glutâmicos modificados, comparando a relação entre o bloqueio de IgE e a concentração desses aminoácidos. O D-ácido glutâmico (E1) desencadeou 25%, 42% e 48% de bloqueio da IgE quando utilizado nos volumes de 10 µL, 15 µL e 20 µL, respectivamente. Bloqueio da IgE de apenas 32%, 30% e 38% foi observado quando utilizamos o ácido - N-metil-L- glutâmico (E2) nestes mesmos volumes, respectivamente, 42%, 35% e 31% de bloqueio da IgE foram observados na incubação do soro com N-acetil-L-ácido glutâmico (E3). O ácido - N-(4-nitrobenzoi)-L- glutâmico (E4) promoveu 45%, 90% e 100% o bloqueio de IgE nos respectivos volumes testados, e o ácido- N-carbamil-L- glutâmico (E5) bloqueou 33%, 52% e 90%.

Estes resultados indicam que o E4, N-(4-nitrobenzoi)-L- ácido glutâmico é um bom agente bloqueador da IgE, assim como N-carbamil-L- ácido glutâmico (E5). Nas condições ensaiadas, ao incubarmos o soro com 20 µL da solução do aminoácido, a porcentagem de bloqueio foi de 100% e 90%, para o E4 e o E5, respectivamente. Não observamos mudança significativa no percentual de bloqueio para os aminoácidos E1, E2 e E3 nos volumes empregados.

#### **4.2.2 – Curva de concentração utilizando o aminoácido N-(4-nitrobenzoi)-L- ácido glutâmico (E4)**

O ácido glutâmico modificado L – ácido - N – (4 – Nitrobenzoyl –glutâmico) (E4) demonstrou os melhores resultados nos ensaios de bloqueio (Figura 8 e 9). Este aminoácido demonstrou bloqueio de 100% da interação entre a IgE com os alérgenos de mamona, de forma similar ao L-ácido glutâmico (Glu). Desta forma, ele foi o mais indicado para prosseguirmos nos ensaios de bloqueio para avaliarmos a relação entre o título de anticorpo e a concentração do bloqueador. Portanto, realizamos ensaio imuno-enzimático para avaliar sua atividade bloqueadora utilizamos três diferentes concentrações desse aminoácido para estabelecer a relação entre a concentração do agente bloqueador e o título do anticorpo presente no soro. O resultado deste ensaio pode ser observado na figura 10.



**Figura 10** - Relação entre a concentração do aminoácido (E4) e o bloqueio de IgE. Soro imune anti-albumina 2S de mamona (1:10) incubado com o N-(4-nitrobenzoil)-L- ácido glutâmico (E4), com volumes crescentes 10 µL, 15 µL e 20 µL da solução de aminoácido 0,5 µM/µl. Anticorpo primário: (1:10); anticorpo secundário (1:2000).

Este resultado demonstra que existe uma relação diretamente proporcional entre a concentração do aminoácido (E4) e o bloqueio de IgE no soro imune, pois, no volume de 10 ul observamos, aproximadamente, 51% de bloqueio, já utilizando 15 ul foi observado, 75%, enquanto com 20 µL de solução bloqueadora observamos o bloqueio total da IgE (100%).

### 4.3 - Avaliação da resposta imunológica no modelo animal:

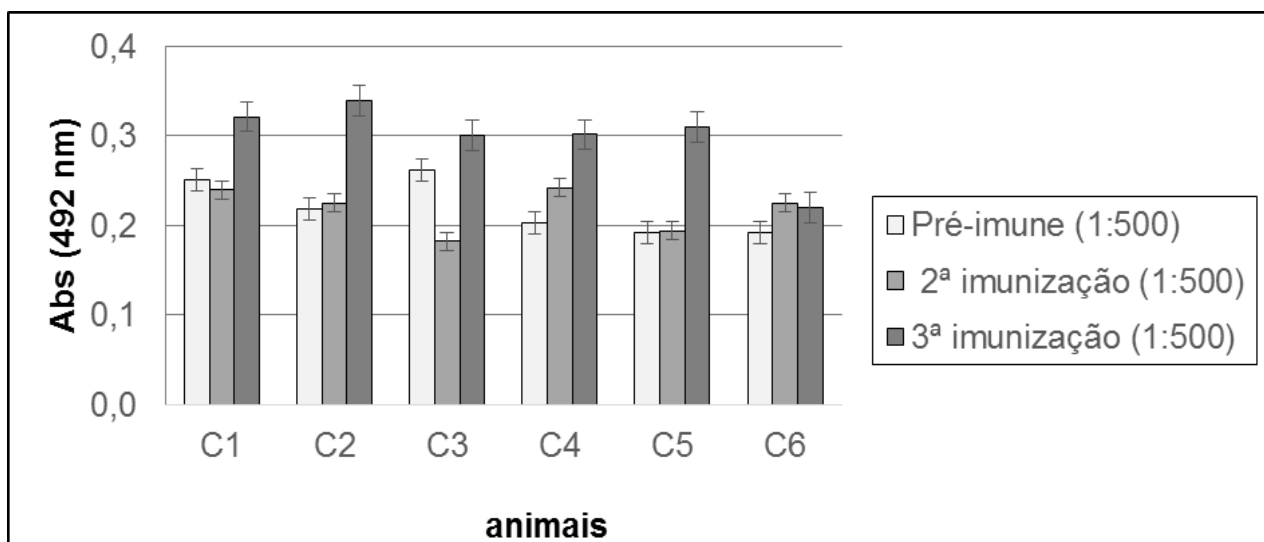
#### 4.3.1- Imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona:

O primeiro protocolo de imunização utilizado foi com 1 µg de albumina 2S de mamona com 4 mg de hidróxido de alumínio/inoculação. Os camundongos Balb/c (n= 6 fêmeas de 5 a 6 semanas) foram imunizados em intervalos de, aproximadamente, 20 dias, como mostra o modelo experimental apresentado no item 3.3. Os animais submetidos a estas imunizações apresentavam-se saudáveis, e não observamos nenhum óbito durante as etapas de imunizações. Todas as

amostras de soro coletadas dos animais antes (soros pré-imune) e, também aqueles obtidos após as imunizações, foram avaliados quanto a produção de IgG, por ensaios de ELISA. Para caracterizarmos o padrão de resposta humoral induzido por linfócito T auxiliares (helper) do tipo Th2 quantificamos também a presença de IgG1 e IgE específicas nestes soros.

#### 4.3.1.1- Avaliação da resposta IgG específica

A produção de IgG específica anti-albumina 2S nos soros obtidos dos animais imunizados com 1 µg de albumina 2S de mamona/inoculação foi acompanhada por ensaios imuno-enzimáticos utilizando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:500). O resultado da avaliação deste estímulo humoral em cada um dos camundongos (C1 a C6) pode ser observado na figura 11.



**Figura 11** - Produção de IgG específica nos camundongos submetidos a imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona. C1, C2, C3, C4, C5, C6 = camundongos. Anticorpo primário= 1:500; Anticorpo secundário= 1:5000 (n= 3 ±D.P.)

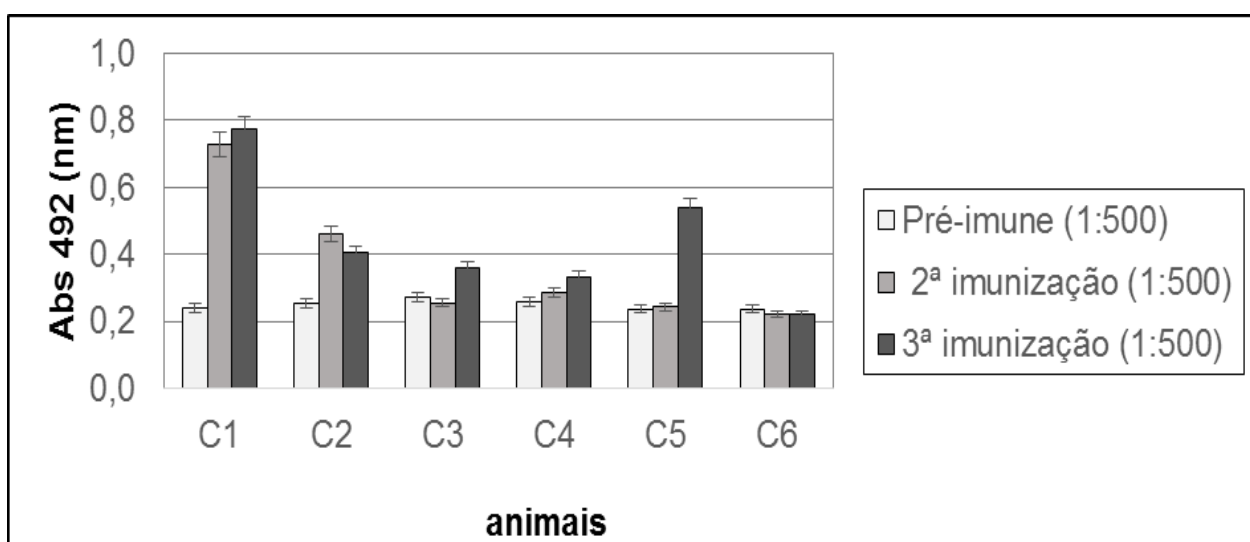
Os dados referentes a presença de IgG específica no soro pré-imune de todos os seis animais mostraram-se com valores abaixo de 0,3 de absorvância. Estes mesmos valores foram observados nos soros coletados dos animais após a 2ª imunização. Os soros dos animais quando pesquisados para presença de IgG específica após a 3ª imunização apresentaram valores abaixo de 0,4. Estes resultados demonstram que os animais imunizados com 1 µg de albumina 2S de



mamona estão sendo pouco estimulados para a produção de anticorpos IgG anti-albumina 2S de mamona.

#### 4.3.1.2 - Avaliação da resposta IgG1 específica

A pesquisa de IgG1 específica nos soros obtidos dos animais imunizados com 1 µg de albumina 2S de mamona/inoculação também foi acompanhada por ensaios imuno-enzimáticos utilizando anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo (1:500). O resultado desta avaliação pode ser observado na figura 12.

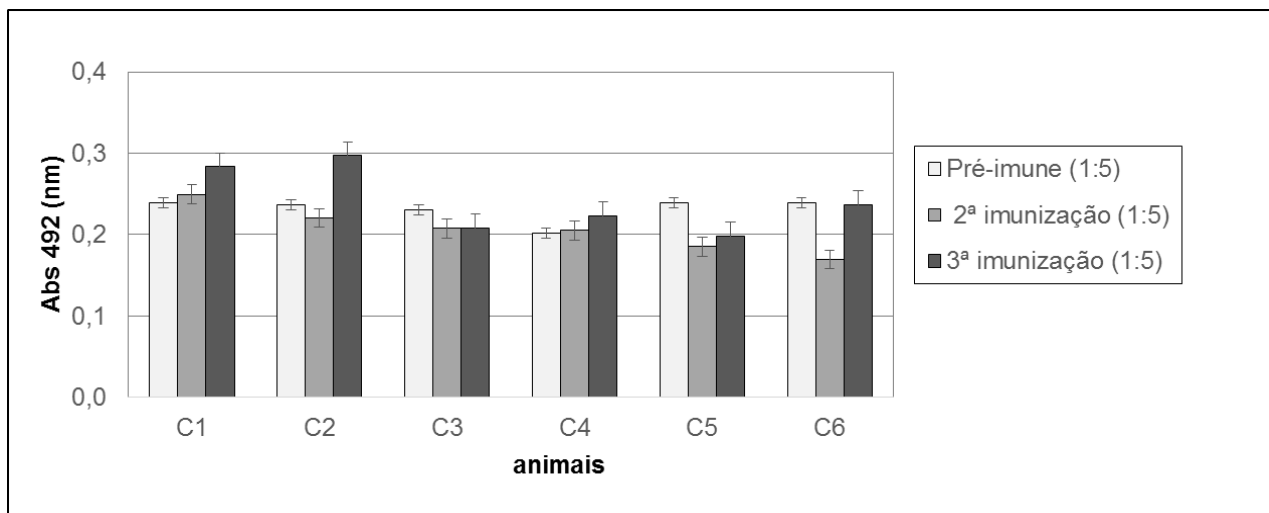


**Figura 12** - Produção de IgG1 específica nos camundongos submetidos a imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona. C1, C2, C3, C4, C5, C6 = camundongos. Anticorpo primário= 1:500, Anticorpo secundário= 1:1000 (n=3 ±D.P.)

Nesse resultado (figura 12) podemos observar pela análise comparativa que o camundongo 1 (C1) produziu IgG1 específica desde após a segunda imunização, com valores de absorvância de aproximadamente 0,8. Nos camundongos 2, 3, 4 e 6 foram quantificados baixos níveis de anticorpo IgG1 específicos, com valores de absorvância abaixo de 0,5. Para o camundongo 5 (C5), podemos observar presença de IgG1 específica somente após a 3ª imunização com valores aumentados de absorvância (aproximadamente 0,6), quando comparados aos dados do soro pré-imune e ao da 2ª imunização.

#### 4.3.1.3 - Avaliação da resposta IgE específica

Para avaliar a presença de IgE anti-albumina 2S nos soros do camundongos por ensaios de ELISA utilizamos anti-IgE de camundongo (1:5) como anticorpo secundário. O resultado deste ensaio pode ser observado na figura 13.



**Figura 13** - Produção de IgE específica nos camundongos submetidos a imunização com 1  $\mu$ g de albumina 2S de mamona. C1, C2, C3, C4, C5, C6 = camundongos. Anticorpo primário= 1:5; Anticorpo secundário= 1:2000 (n= 3  $\pm$ D.P.)

A presença de IgE específica (Figura 13) no soro pré-imune de todos os animais imunizados mostraram-se com valores abaixo de 0,3. Estes mesmos valores foram quantificados nos soros coletados dos animais após a 2ª imunização. Somente os camundongos 1 e 2 apresentaram pouco aumento dos valores de IgE específica após a 3ª imunização, como pode observado na figura 13.

Desta forma, podemos observar que os camundongos não foram estimulados a produzirem IgE ao longo das imunizações com 1  $\mu$ g da proteína, apresentando valores muito baixos (ABS > 0,4) desta imunoglobulina ao longo das imunizações.

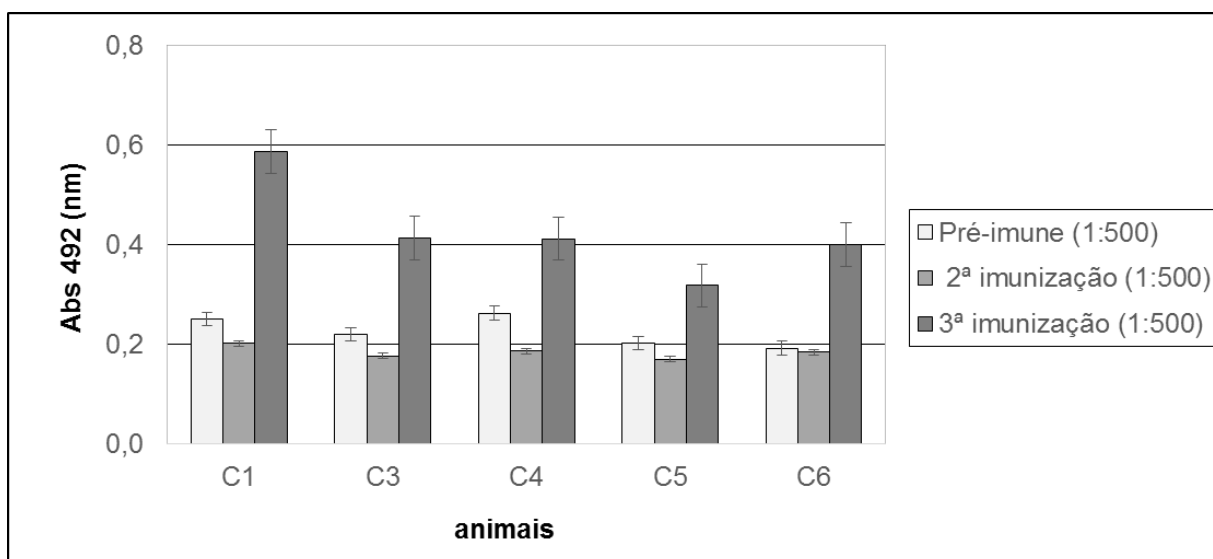
#### 4.3.2 - Imunização com 10 $\mu$ g de albumina 2S de mamona:

Neste protocolo os animais foram imunizados com 10  $\mu$ g de albumina 2S de mamona e a quantidade de adjuvante utilizada foi de 5,0 mg de hidróxido de alumínio/inoculação. Utilizamos 6 fêmeas de camundongos BALB/c de 5 a 6 semanas imunizados em intervalos de, aproximadamente, 20 dias, como mostra o modelo experimental apresentado no item 3.3.

Os animais submetidos a estas imunizações apresentavam-se saudáveis, porém, ao iniciarmos as imunizações o segundo camundongo imediatamente após receber a primeira dose do antígeno, morreu, mas, não observamos mais nenhum óbito durante as etapas seguintes. Os soros pré-ímmune, após a segunda e terceira imunizações de todos os animais restantes foram avaliados quanto a produção de IgG, IgG1 e IgE específica.

#### 4.3.2.1 - Avaliação da resposta IgG específica

A produção de IgG específica no organismo dos animais imunizados com 10 µg de albumina 2S de mamona/inoculação foi acompanhada por ensaios imunoenzimáticos utilizando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:500). O resultado da avaliação do estímulo humoral pode ser observado na figura 14.



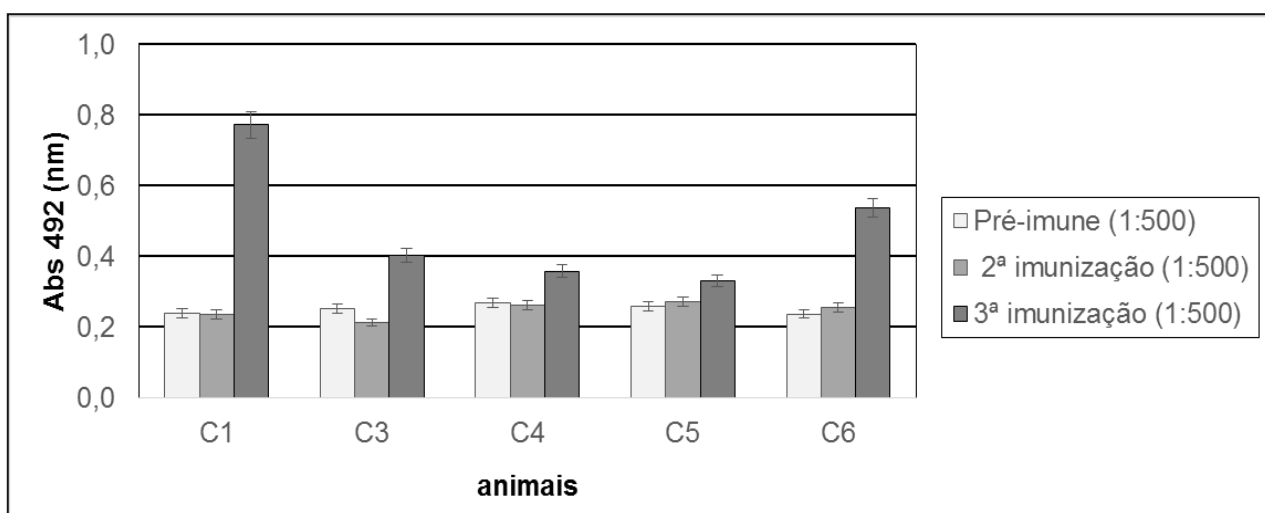
**Figura 14** - Produção de IgG específica nos camundongos submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona. C1, C3, C4, C5, C6 = camundongos. Anticorpo primário = 1:500, Anticorpo secundário=1:5000 (n= 3 ±D.P.)

Os valores obtidos do acompanhamento da resposta de IgG específica no soro dos camundongos imunizados contra 10 µg de albumina 2S pode ser observado na figura 14. O camundongo 5 e 6 apresentaram valores abaixo de 0,4 de absorbância, respectivamente, quando pesquisada esta imunoglobulina no soro pré-ímmune e, também no soro após as 2ª e 3ª imunizações. Já o soro dos camundongos 1, 3 e 4 apresentaram índices acima de 0,4 de absorbância para este anticorpo no soro

obtido após a 3ª imunização, sendo que, o camundongo 1 apresentou melhor resposta, com valores de aproximadamente 0,6.

#### 4.3.2.2- Avaliação da resposta IgG1 específica

A produção de IgG1 específica nos soros obtidos dos animais imunizados com 10 µg de albumina 2S de mamona/inoculação também foi acompanhada por ensaios imuno-enzimáticos utilizando anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo (1:500). O resultado da avaliação do estímulo humoral pode ser observado na figura 15.

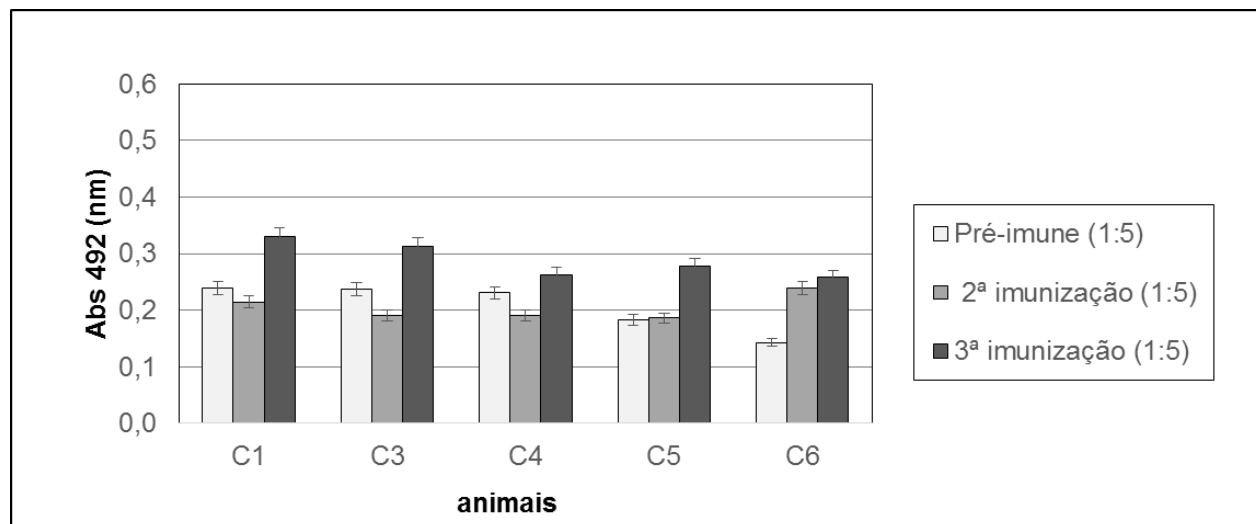


**Figura 15** - Produção de IgG1 específica nos camundongos submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona. C1, C3, C4, C5, C6 = camundongos. Anticorpo primário= 1:500, anticorpo secundário=1:1000 (n= 3 ±D.P.)

A figura 15 acima apresenta os resultados da quantificação da presença de IgG1 no soro dos camundongos imunizados com 10 µg de albumina 2S. Estes dados demonstram que os camundongos 3, 4 e 5 não foram estimulados para produção desta imunoglobulina, com valores abaixo de 0,4. Os camundongos 1 e 6 apresentaram melhores respostas quanto a produção deste anticorpo, sendo que, no camundongo 1, foi quantificado valores de absorvância de, aproximadamente, 0,8 para esta imunoglobulina. Este resultado demonstra que os animais imunizados estão sendo estimulados para a produção de anticorpos IgG1 anti-albumina 2S de mamona ao longo das imunizações.

#### 4.3.2.3- Avaliação da resposta IgE específica

Para avaliar a presença de IgE anti-albumina 2S nos soros obtidos dos animais realizamos ensaios de ELISA utilizando anti-IgE de camundongo como anticorpo secundário (1:5). O resultado do ensaio pode ser observado na figura 16.



**Figura 16** - Produção de IgE específica nos camundongos submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona. C1, C3, C4, C5 e C6= camundongos. Anticorpo primário= 1:5; Anticorpo secundário= 1:2000 (n= 3 ±D.P.)

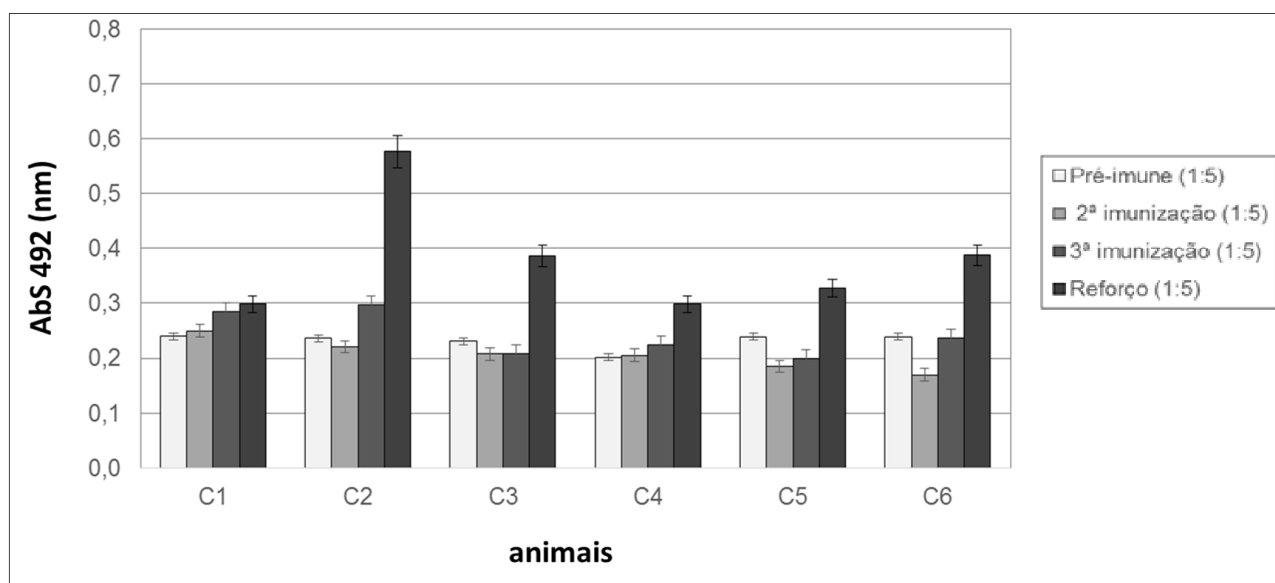
Os resultados apresentados na figura 16 para imunizações com 10 µg de proteína se assemelham aos dados apresentados na figura 13, para imunizações com 1,0 µg de albumina 2S de mamona. A presença de IgE específica no soro pré-imune de todos os animais imunizados mostrou-se com valores de absorvância de, aproximadamente, 0,2. Estes mesmos valores foram quantificados nos soros coletados dos animais após a 2ª imunização. Somente após a 3ª imunização que foram detectados aumento deste anticorpo no soro de todos os camundongos, valores de aproximadamente 0,3.

#### 4.3.3- Avaliação da resposta IgE específica após dose de reforço

Para avaliarmos a resposta desencadeada nos animais com relação ao estímulo para produção de IgE anti-albumina 2S, frente a uma dose reforço realizada durante 2 dias, todos os animais previamente imunizados (1 ug ou 10 ug) receberam uma dose de 10 ug de alérgeno, sem adjuvante. O acompanhamento da

produção desta imunoglobulina ao longo das imunizações nos soros foi também avaliado por ELISA, e o resultado pode ser observado nas figuras 17 e 18.

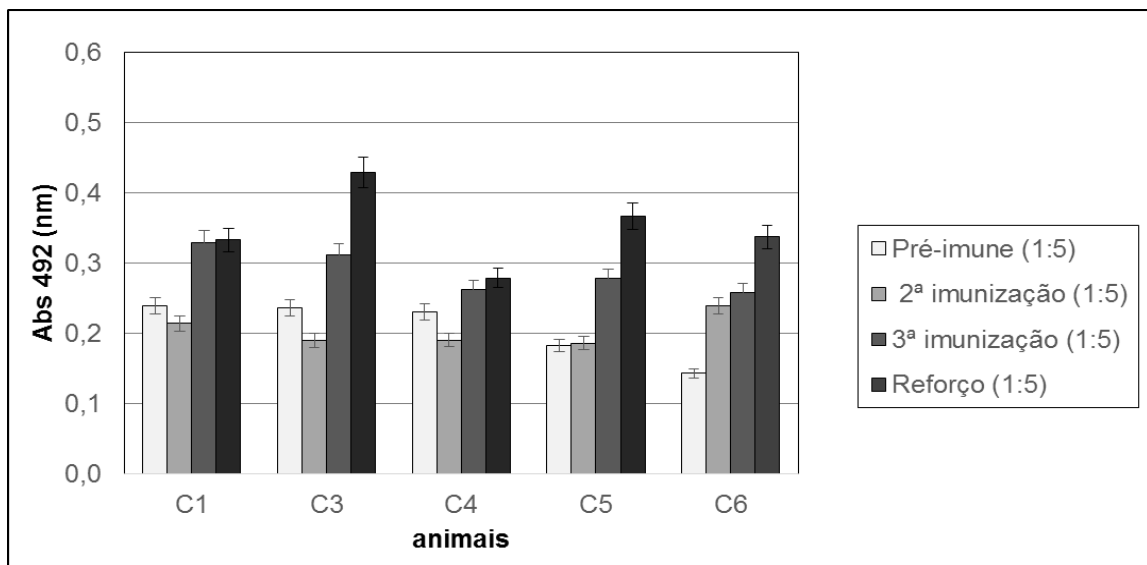
A quantificação da IgE ao longo das imunizações foi realizada nos animais previamente imunizados com 1 µg de albumina 2s de mamona. O ensaio para detecção deste anticorpo no soro do camundongo 1 demonstrou ausência de estímulo do organismo para produção desta imunoglobulina, mesmo após a dose de reforço, como pode ser observado pelas barras apresentadas na figura 17. Para os camundongos 2, 3, 4, 5 e 6 observamos um aumento de IgE após a dose de reforço realizada, sendo o camundongo 2 com a melhor resposta, com valores de absorvância acima de 0,5. Este resultado demonstra que os animais responderam ao reforço, aumentando a produção de IgE.



**Figura 17** - Produção de IgE específica nos camundongos inicialmente submetidos a imunização com 1 µg de albumina 2S de mamona. C1, C2, C4, C5 e C6= camundongos. Anticorpo primário= 1:50 e 1:5; Anticorpo secundário=1:2000 (n= 3 ±D.P.)

Ensaio para detecção de IgE no soro dos camundongos submetidos ao protocolo de imunizações com 10 µg de albumina 2S de mamona foram realizados. Como descrito anteriormente, o camundongo 2 (C2) morreu imediatamente após receber a dose do antígeno. Nos resultados destes testes podemos observar que não houve alteração significativa na presença desta imunoglobulina nos camundongos 1 e 4 após a dose de reforço realizada, com valores abaixo de 0,4.

Um estímulo de produção de IgE após dose de reforço foi observado nos camundongos 3 e 5, com valores acima de 0,5 para C3 e de próximo a 0,4 para C5. Na Figura 18 podemos observar que após a dose reforço, houve um aumento na produção de IgE para os animais C3, C5 e C6.



**Figura 18** - Produção de IgE específica nos camundongos inicialmente submetidos a imunização com 10 µg de albumina 2S de mamona. C1, C3, C4, C5 e C6= camundongos. Anticorpo primário= 1:5; Anticorpo secundário=1:2000 (n= 3 ±D.P.)

## 5 - DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de ácidos glutâmicos modificados como agentes bloqueadores de IgE, através de ensaios *in vitro*, para o desenvolvimento de uma nova estratégia para o tratamento da alergia, baseado no bloqueio da interação do alérgeno com a IgE. Esta proposta é fundamentada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa que vem estudando, ao longo dos anos, a estrutura da albumina 2S de mamona e dos epitopos de ligação à IgE, visando estudos de diversas abordagens de tratamento imunoterapêutico através da utilização de várias estratégias metodológicas.

O nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a importância de ácidos glutâmicos na formação dos epitopos de ligação à IgE, ao identificá-los nas duas isoformas alergênicas, Ric c 1 e Ric c 3, das albuminas 2S de mamona (FÉLIX, 2007). A hipótese de que o ácido glutâmico se ligue ao sítio de interação da IgE com o alérgeno foi confirmada através do trabalho realizado por Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011, o qual demonstrou por ensaios de bloqueio *in vitro*, que quando o soro contendo IgE anti-albumina 2S era incubado com o L-ácido glutâmico a ligação de IgE ao antígeno era bloqueada pela ocupação por este aminoácido. Nesse mesmo trabalho também foi visto que alérgenos de outras fontes, como camarão, peixe, trigo, milho e alguns aeroalérgenos, apresentam reação cruzada com albumina 2S de mamona e, sua ligação a IgE também era bloqueada pelo L-ácido glutâmico. Os resultados positivos obtidos através desse trabalho nos impulsionaram a avaliar o uso de aminoácidos livres como agentes bloqueadores de IgE.

Sabe-se que o ácido glutâmico é principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central, e diversos estudos relatam que a estimulação excessiva dos receptores de glutamato podem causar efeitos neurotóxicos, também conhecido como excitotoxicidade que provoca danos neuronais (JAYANARAYANAN *et al.*, 2013; DELYFER *et al.*, 2005; GILL E PULIDO, 2001). Nesse sentido, propomos a utilização de compostos alternativos derivados do ácido glutâmico capazes de impedir a ligação do alérgeno, albumina 2S de mamona, às IgEs específicas *in vitro* e, por serem ácidos glutâmicos modificados não sejam reconhecidos pelas vias sinápticas, podendo, futuramente, ser utilizado em testes *in vivo* no tratamento da alergia.



Inicialmente, investigamos através do ensaio imunoenzimático (ELISA), a presença de IgE anti-albumina 2S em seis soros de camundongos já disponíveis no laboratório (figura 7). Nestes ensaios, a placa foi sensibilizada com 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de albumina 2S de mamona. Nestes testes, observamos absorvância ( $\text{Abs} > 0,5$ ) para diluições 1:5 no soro denominado D, indicando a presença de IgE específica nesse soro. Desta forma, as concentrações de IgE nos soros diluídos foram ajustadas a valores de ABS entre 0,4 e 0,6, a fim de padronizarmos as condições dos diversos ensaios de bloqueio. O soro D, portanto, foi selecionado para ser utilizado nos ensaios de bloqueio com os ácidos glutâmicos modificados propostos neste trabalho.

Os ensaios de bloqueio foram realizados por ELISA, em que o soro imune D, produzido em camundongo, foi incubado com cada um dos cinco ácidos glutâmicos modificados. Como controle positivo de bloqueio foi utilizado o L – ácido glutâmico (Glu) incubado com o soro. Estes compostos foram utilizados em concentração ajustada para 0,05  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$  em tampão PBS e, o soro foi incubado com esta solução em pH de aproximadamente 7.2, um pH fisiológico em que a IgE funciona bem, conforme foi demonstrado por Chung e Reed (2015). No resultado apresentado na figura 8 observamos o perfil de bloqueio de todos os aminoácidos avaliados como agentes bloqueadores de IgE. Nesse primeiro ensaio observamos que o N – (4 – Nitrobenzoil)– L – ácido glutâmico (E4) apresentou melhor perfil de bloqueio de IgE, pois impediu 93% a ligação da IgE com os alérgenos de mamona, comparando-se ao L-ácido glutâmico (Glu), demonstrando ser o mais eficiente. Outro aminoácido com resultado promissor nos testes de bloqueio foi o N-carbamil-L- ácido glutâmico (E5), o qual bloqueou 42% a IgE. A partir desses resultados podemos sugerir novos ensaios de bloqueio utilizando concentrações maiores desses compostos, visando padronizar a relação existente entre a concentração do bloqueador e a molécula de IgE.

Os ensaios de bloqueio de IgE pelos agentes bloqueadores propostos neste trabalho foram avaliados por ELISA. Realizamos ensaio de bloqueio comparando todos os cinco ácidos glutâmicos modificados com soluções na concentração de 0,5  $\mu\text{M}/\mu\text{l}$  em três volumes crescentes de 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$  (Figura 9) e, a partir desse resultado podemos observar que o N-(4-nitrobenzoil)-L- ácido glutâmico (E4) foi eficiente e, nesse ensaio destacam-se os compostos: N-(4-nitrobenzoil)-L- ácido

glutâmico (E4) e o N-carbamil-L-ácido glutâmico (E5) apresentando bloqueio de 100% e 90%, respectivamente. Em outro teste analisamos a relação entre a concentração do aminoácido N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico e a IgE utilizando solução dos aminoácidos na concentração de 0,5  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$  em três volumes crescentes de 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$ . Cada um dos candidatos a bloqueadores foram previamente incubados com o soro contendo IgE anti-albumina 2S de mamona (1:10), a fim de observarmos o perfil de bloqueio da IgE por estes aminoácidos. Inicialmente, testamos o composto N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico (E4), pois este destacou-se nos ensaios anteriormente descritos, sendo o mais eficiente. O resultado apresentado na figura 10 demonstra a eficiência de bloqueio desse composto demonstrando uma relação proporcional de dose/dependente alcançando 100% de bloqueio de IgE quando adicionados 20  $\mu\text{L}$  da solução a 0,5  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ . Dessa forma consideramos que os agentes E4 e E5 interagiram melhor com a IgE e impediram, de forma eficiente, a ligação com o alérgeno *in vitro*.

A interação eletrostática, entre os aminoácidos derivados do ácido glutâmico e a molécula de IgE é uma possível explicação para a eficácia do bloqueio pois, a um pH 7.2, pH fisiológico em que a IgE não perde sua função, o ácido glutâmico transporta cargas negativas em seu grupamento carboxílico podendo formar pares de íons com os resíduos de aminoácidos carregados positivamente presentes nas moléculas de IgE. Esta interação eletrostática entre IgE e os aminoácidos livres tem sido relatada na literatura. O aminoácido lisina, por exemplo, demonstrou ser capaz de se ligar a anticorpos IgE e inibi-los (YU *et al*, 2008; ZHAO *et al.*, 2000). Outro aminoácido descrito como importante para ligação do alérgeno da poeira de ácaros a IgE é o ácido aspártico (CHOU *et al*, 2011; RASHID *et al*, 2010). Além das interações eletrostáticas entre o bloqueador e a IgE, outro fato a ser considerado são as alterações conformacionais que ocorrem na molécula de IgE. Estas mudanças estruturais podem estar envolvidas no mecanismo de ligação entre IgE e os aminoácidos, N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico (E4) e o N-carbamil-L-ácido glutâmico (E5), agentes que apresentaram melhores resultados nos ensaios de bloqueio. Conforme demonstrado por Hubbard, Thorkildson, Welch, e Kozela (2013), as reações de ligação podem envolver mudanças conformacionais pelo anticorpo ou pelo antígeno antes de se formar o complexo antígeno-anticorpo. De acordo com isso, podemos sugerir que algumas mudanças conformacionais podem ter ocorrido

na molécula de IgE ao ser incubada na presença dos ácidos glutâmicos modificados, promovendo sua ligação a IgE. Embora os demais ácidos glutâmicos modificados não tenham se ligado a IgE sob as condições testadas nesse trabalho e, não ter promovido o bloqueio da interação com o alérgeno, novos ensaios com diferentes concentrações utilizando esses mesmos compostos modificados podem ser avaliadas dentro dessa proposta.

Para obtermos soro com altos níveis de IgE específica e avaliarmos o perfil de resposta do modelo animal camundongos BALB/C, utilizamos dois protocolos de imunização, no primeiro protocolo os animais foram imunizados com 1 µg de albumina 2S na presença de 4 mg de hidróxido de alumínio/inoculação. Antes e durante as etapas de imunização coletamos o sangue dos animais e avaliamos, para cada intervalo de aproximadamente 20 dias de inoculação, o perfil de produção de imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgE específicas. No resultado apresentado na figura 11, observamos que os camundongos foram pouco estimulados a produzirem IgG específica ao longo das imunizações. Porém, quando avaliamos o perfil de IgG1 específica nesses camundongos observamos um estímulo para produção desse anticorpo ao longo das imunizações. Como essa imunoglobulina é característica do perfil Th2, observamos a tendência para esse tipo de resposta, principalmente no camundongo 1 que apresentou melhor resposta (figura 12). A partir da análise da figura 13 observamos que os camundongos não foram estimulados a produzirem IgE ao longo das imunizações com 1 µg da proteína, apresentando valores muito baixos ( $ABS > 0,4$ ), apesar de estarem produzindo IgG1.

Iniciamos um novo protocolo de imunização utilizando 10 µg da proteína albumina 2S e 5,0 mg de hidróxido de alumínio, os camundongos apresentavam-se saudáveis. Seguimos com as imunizações, três ao todo, com intervalos de 20 dias entre as etapas e, novamente avaliamos o perfil de imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgE. A análise da figura 14 demonstra que animais imunizados com 10 µg de albumina 2S de mamona foram mais estimulados para a produção de anticorpos IgG anti-albumina 2S de mamona ao longo das imunizações quando comparado aos animais submetidos a 1 µg de proteína/imunização descrito anteriormente. A produção de IgG1 também foi avaliada (figura 15), nesse resultado observamos que os animais imunizados foram estimulados ao longo das imunizações, porém não observamos mudanças significativas entre os dois protocolos de imunização. Avaliamos o perfil

da produção do anticorpo IgE específica (figura 16) e notamos que os valores para IgE se apresentaram muito baixos nos dois protocolos de imunização. Dessa forma, realizamos uma dose reforço em todos os animais submetidos aos dois protocolos somente com a proteína (10 µg) sem o adjuvante e, posteriormente, observamos a resposta desses animais quanto a produção de IgE. O resultado apresentado na figura 17 mostra que os animais imunizados com 1 µg de albumina 2S de mamona, após dose de reforço, aumentaram os níveis de IgE sendo, o camundongo 2 o mais estimulado, pois atingiu valores de Abs > 0,5), no entanto os animais que foram inicialmente imunizados com 10 µg da proteína (figura 18), não apresentaram estímulo significativo permanecendo com valores muito baixos (ABS entre 0,3 e 0,4).

As análises dos resultados das imunizações para produção de IgE contra os alérgenos da mamona, trazem a discussão de alguns fatores que podem afetar diretamente a produção desses anticorpos, tais como, a infecção por helmintos. Estudos demonstram que esse tipo de infecção pode atenuar a resposta alérgica ou promover tolerância, sugerindo que as propriedades anti-inflamatórias da IL-10 induzidas pelos helmintos podem causar o efeito de diminuição da produção de IgE específica contra alérgenos (VAN DEN E VAN REN *et al.*, 2000).

Podemos observar que no soro pré-imune haviam leituras de absorbância próximas a 0,3, sendo maiores do que após a primeira imunização (figuras 13 e 16). Na literatura também já foi relatado que os níveis elevados de IgE resultantes de infecções parasitárias saturam os receptores de IgE nos mastócitos e, podem impedir a ligação de quantidades suficientes de IgE específica contra alguns alérgenos (NIELSEN *et al.*, 1994). Diversos estudos foram realizados utilizando camundongos BALB/c como modelo animal por desenvolverem resposta do tipo Th 2 e, serem bons produtores de IgE (ARAE *et al.*, 2011; ALDEMIR *et al.*, 2009; LADICS *et al.*, 2010; DIESNER *et al.*, 2008; HEROUET-GUICHENEY *et al.*, 2008; KIMBER, 2007). Porém, não observamos resultados positivos para produção de IgE no nosso trabalho, condizentes com dados descritos na literatura. Segundo Chen *et al.* (2013), para a sensibilização com ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c, os níveis mais elevados de IgE específica foram obtidos após cinco imunizações com uma dose de 0,05 mg da proteína. Com base nesses dados podemos sugerir que a quantidade de imunizações em intervalos menores e mudanças na concentração da proteína devem ser feitas para que novas imunizações com estes

ajustes sejam realizadas para garantir resultados satisfatórios quanto a produção de IgE.

Sabe-se da importância do desenvolvimento de novas estratégias de tratamento da alergia, devido ao aumento das reações alérgicas ao longo dos anos (AKDIS E AKDIS, 2011; HOLGATE; POLOSA, 2008; NOWAK-WE; SAMPSON, 2013; SILVA, 2008) Sendo assim, este trabalho propõe uma abordagem alternativa ao utilizar compostos derivados do ácido glutâmico como agentes bloqueadores de IgE para alérgenos de mamona e, espera-se com esses resultados elucidar os mecanismos de tratamento para alergia causada por alérgenos de outras fontes.

De acordo com dados obtidos dos ensaios de bloqueio da IgE obtidos neste trabalho, podemos discutir que a abordagem alternativa para o tratamento da alergia deve considerar diversos fatores que envolvem os mecanismos de interação da IgE com alérgeno a partir da elucidação da participação dos aminoácidos na formação do epitopo de ligação a IgE presentes na proteína alergênica. Além disso, novos ensaios de bloqueio de IgE *in vitro* devem ser conduzidos e ajustados para análises futuras. Sabe-se que vários fatores podem interferir na produção de IgE específica durante as etapas de imunização de um organismo e, dessa forma é necessário aprimorar os protocolos de imunização utilizando como antígeno a albumina 2S de mamona. Algumas mudanças deverão ser feitas para melhorar os resultados de produção de IgE, por exemplo, alterações na via de inoculação, na dose do antígeno e/ou nos adjuvantes empregados.

A partir dos resultados *in vitro* positivos obtidos neste trabalho, pretendemos prosseguir com estudos dessa abordagem imunoterapêutica, avaliando o perfil de bloqueio dos compostos derivados do ácido glutâmico *in vivo*. Desta forma, necessita-se analisar cada um desses compostos com agentes bloqueadores de IgE e seus possíveis efeitos colaterais ao ser administrado *in vivo* e, com esses ensaios, pretende-se avançar na busca de tratamento alternativo para alergia por bloqueio de IgE através do medicamento proposto.

## 6 – CONCLUSÃO

- Dois ácidos glutâmicos modificados foram identificados como agentes bloqueadores da IgE: o ácido - N-(4-nitrobenzoil)-L- glutâmico (E4) e o ácido - N-carbamil-L- glutâmico (E5), com 100% e 92% de bloqueio, respectivamente.
- O bloqueio da IgE ocorreu de forma dose dependente, nos volumes crescentes de 10  $\mu$ L, 15  $\mu$ L e 20  $\mu$ L.
- O protocolo de imunização dos animais com 10  $\mu$ g de antígeno, acrescidos de uma dose reforço com 10 $\mu$ g, apresentou resultados promissores para a produção de soros enriquecidos em IgE nos camundongos.
- O bloqueio de IgE por compostos derivados de ácido glutâmico pode ser uma abordagem para o tratamento da alergia, embora necessite ainda de maiores estudos *'in vivo'*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALBERSE, R.C. Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106: p. 228-238, 2000.
- ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. 4 ed., Revinter, p.544, 2003.
- ABBAS, A. K. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2008.
- AKDIS, C. A. AKDIS, M. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , Volume 127 , Issue 1 , 18 - 27
- ALDEMIR, H., BARS, R., HEROUET-GUICHENEY, C., Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54 (3), 52-57, 2009.
- ARAE, K., OBOKI, K., OHNO, T., HIRATA, M., NAKAE, S., TAGUCHI, H., SAITO, H., NAKAJIMA, T., Cimetidine enhances antigen-specific IgE and Th2 cytokine production. *Allerg. Int.* 60, 339–344, 2011.
- ATADASHI, I.M.; AROUA, M.K. & ABDUL AZIZ, A. Biodiesel separation and purification: A review. *Renewable Energy*. Vol.36, Issue2, pp. 437 – 443, ISSN: 0960-1481, 2010.
- AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. *O agronegócio da mamona no Brasil*. 1 ed., Editora Embrapa, 2001.
- BBCBRASIL.COM. Suspeitos de produzir ricina são acusados de terrorismo, Disponível em: <[http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2003/030111\\_ricinaae.shtml](http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2003/030111_ricinaae.shtml)>. Acesso em 23/01/2016, 2003.
- BELTRÃO, N. E. M., AZEVEDO, D. M. P. FITOLOGIA. IN: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2º ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504 p., 2007.
- BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., STRYER, L. *Bioquímica*. 5 ed., Editora Guanabara, p.51, 2004.
- BERMAN, PAULA, SHAHAR NIZRI, AND ZEEV WIESMAN. “Castor Oil Biodiesel and Its Blends as Alternative Fuel.” *Biomass and Bioenergy* 35 (7). Elsevier Ltd: 2861–66. doi:10.1016/j.biombioe.2011.03.024, 2011.
- BUTCHER, S.P., SANDBERG, M., HAGBERG, H., AND HAMBERGER, A. Cellular origins of endogenous amino acids released into the extracellular fluid of the rat estradiol during severe insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* 48, 722–728. 1987.

BUFE A. Significance on IgE- binding epitopes in allergic disease. J Allergy Clin Immunol;107:219-21, 2001.

BREITENEDER, H. E RADAUER, C. A. Classification of plant food allergens. Journal of allergy and clinical immunology. Vol.113, N 5, p. 821- 830, ISSN: 0091-6749, 2004.

BREITENEDER, H., MILLS, C.E.N. Plant food allergens – structural and functional aspects of allergenicity. Biotechnology Advances. Vol.23, Issue6, pp. 395-399, ISSN: 0734-9750, 2005.

CARRIELO-GAMA, C. Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epitopos alergênicos de *Ricinus communis* (mamona). **Monografia** (Bacharelado em Biociências e Biotecnologia), Campos dos Goytacazes – RJ - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, 2006.

CARTAXO, W. V.; BELTRÃO, N. E. M.; SILVA, O. R. R. F. SEVERINO, L. S.; SUASSUNA, N. D.; SOARES, J. J. O cultivo da mamoneira no semi-árido brasileiro. Campina Grande: Embrapa Algodão, 20p. (Circular Técnica, 77), 2004.

CARVALHO, N. M. & NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP, 4 ED. 588p, Microbiologia médica e imunologia - 12.ed., 2000.

CÉSAR, A.S., BATALHA, M.O., Biodiesel production from castor oil in Brazil: a difficult reality. Energy Policy 38, 4031–4039, 2010.

CHAMBI, HULDA N M, ROSELI S. LACERDA, GISELE L A MAKISHI, ANA MONICA Q B BITTANTE, CATARINA A. GOMIDE, AND PAULO J A SOBRAL. “Protein Extracted from Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) Cake in High pH Results in Films with Improved Physical Properties.” Industrial Crops and Products 61. Elsevier B.V.: 217–24. doi:10.1016/j.indcrop.2014.07.009, 2014.

CHEN, NANA SUN, YONGNING LI, E XUDONG JIA.. “A BALB/c Mouse Model for Assessing the Potential Allergenicity of Proteins: Comparison of Allergen Dose, Sensitization Frequency, Timepoint and Sex.” Food and Chemical Toxicology 62. Elsevier Ltd: 41–47. doi:10.1016/j.fct.2013.08.004, 2013.

CHOU, H., TAM, M. F., LEE, S. S., TANG, R. B., LIN, T. H., TAI, H. Y. Asp159 is a critical core amino acid of an IgE-binding and cross-reactive epitope of a dust mite allergen Der f 7. Molecular Immunology, 48(15–16), 2130–2134, 2011.



CHUNG, SI-YIN, E SHAWNDRIKA REED.. “IgE Binding to Peanut Allergens Is Inhibited by Combined D -Aspartic and D -Glutamic Acids.” FOOD CHEMISTRY 166. Elsevier Ltd: 248–53. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.004, 2015

DEARMAN, R.J., KIMBER, I., Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. Clin. Exp. Allerg. 39 (4), 458–468, 2009.

DELYFER MN, SIMONUTTI M, NEVEUX N, LEVEILLARD T, SAHEL JA. DOES GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST? Mol Vis.,11:677-87, 2005

DEUS-DE-OLIVEIRA N., FELIX AP, CARRIELO-GAMA, FERNANDES KV, DA MATTA R.A. Identificação of critical amino acids in the IgE epitopes of ric c1 and Ric c 3 and application of glutamic acid as an IgE blocker. Journal Plos One, Vol. 6, Ed. 21455, 19.1371, 2011.

DEUS-DE-OLIVEIRA, N., MACHADO, O. L. T. Allergens and Toxins from Oleaginous Plants: Problems and Solutions, Environmental Impact of Biofuels, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), ISBN: 978-953-307-479-5, InTech, DOI: 10.5772/18020. Acessoem: <http://www.intechopen.com/books/environmentalimpact-of-biofuels/allergens-and-toxins-from-oleaginous-plants-problems-and-solutions>, 2011.

DEUS-DE-OLIVEIRA N. Alérgenos de oleaginosas: tratamento químico para redução da alergenicidade, detecção no ar e resposta imune. **Tese de doutorado** – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil. 2013.

DIESNER, S.C., KNITTELFELDER, R., KRISHNAMURTHY, D., PALI-SCHOLL, I., GAJDZIK, L., JENSENJAROLIM, E., UNTERSMAJR, E., Dose-dependent food allergy induction against ovalbumin under acid-suppression: a murine food allergy model. Immunol. Lett. 121 (1), 45–51, 2008.

EL-AGAMY, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. Small Ruminant Research. Vol.68, Issue 1-2, pp. 64–72, ISSN: 0921-4488, 2007.

FELIX, S.P. Caracterização de epitopos ligantes de IgE em alérgenos de Ricinus communis e investigação de respostas cruzadas entre alérgenos. **Monografia** – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

FELIX, S. P. Identificação de epitopos alergênicos de albumina 2S de Ricinus communis utilizando como modelos roedores e pacientes atópicos: reações cruzadas com alérgenos alimentares e inalantes e bloqueio através da ocupação

dos sítios de reconhecimento. **Dissertação de mestrado**– Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil. 2007.

FELIX, S. P., MAYERHOFFER, R. O., DAMATTA, R. A., VERÍCIMO, M. A., NASCIMENTO, V. V., MACHADO, O.L.T. Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. *Peptides*.2: 497 – 504, 2008.

FERNANDES, K.V., MACHADO, O.L.T. Approaches for the Detection of Toxic Compounds in Castor and Physic Nut Seeds and Cakes. *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*, Production and Applications, Zhen Fang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0910-5, InTech, DOI:10.5772/52332. Acesso em: <http://dx.doi.org/10.5772/52332>, 2012.

FORNAZIERI, A. Mamona, uma rica fonte de óleo e divisas, Coleção Brasil Agrícola, Editora ícone, São Paulo, 1986.

FREITAS, G.A. Produção e área colhida de mamona no nordeste. Informe Rural ETENE- Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste Ambiente de Estudos e Pesquisas e Avaliação - AEPA, Nº 14, Ano V, 2011.

GARCIA-GONZALEZ JJ, BARTOLOME-ZAVALA B, TRIGO-PEREZ MD, BARCELO-MUNOZ JM, FERNANDEZ-MELENDZ S, NEGRO CARRASCO M.A. Pollinosis to *Ricinus communis* (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study. *Clin. Exp. Allerg*, 29:1265–75, 1999.

GARCÍA-MARTÍNEZ, S., GRAU, A., AGULLÓ, E., BUSTAMANTE, M.A., PAREDES, C., MORAL, R., RUIZ, J.J., Use of compost derived from winery waste in tomato crop. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 40, 445–452, 2009.

GILL S., O. PULIDO, Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology, *Toxicol. Pathol.* 29 208–223, 2001

GOODMAN, L. S., GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ed, 1996.

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; MACIEL, F. M.; FELIX, S. P.; BEVILAQUA, J. B.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 44, p. 317-322, 2009.

GOULD, H.J., SUTTON, B.J. IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology* ,8: 205-217., 2008.

HEROUET-GUICHENEY, C., ALDEMIR, H., BARS, R., DE BARBEYRAC, D., KENNEL, P., ROUQUIÉ, D., STAHL, B.U., KIMBER, I., DEARMAN, R.J., Inter-laboratory comparisons of assessment of the allergenic potential of proteins in mice. *J. Appl. Toxicol.* 29 (2), 141–148, 2008.

HOLGATE, STEPHEN T., E RICCARDO POLOSA.. “Treatment Strategies for Allergy and Asthma.” *Nature Reviews Immunology* 8 (3): 218–30. doi:10.1038/nri2262, 2008.

HOLM, JENS, NICHOLAS WILLUMSEN, PETER A WÜRTZEN, LARS H. CHRISTENSEN, KAARE LUND, PETER A. WRTZEN, E PETER WRTZEN.. “Facilitated Antigen Presentation and Its Inhibition by Blocking IgG Antibodies Depends on IgE Repertoire Complexity.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (4): 1029–37. doi:10.1016/j.jaci.2011.01.062., 2011

IRWIN, S.D., KEEN, J.N., FINDLAY, J.B.C., LORD, J.M. The *Ricinus Communis* 2S albumin precursor: a single prepotrein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. *Mol. Gen. Genetic* 222:400-408, 1990.

IVANCIUC, O.;SCHEIN,C.H.; GARCIA, T.; OEZGUEN,N.; NEGI, S.S.;BRAUN, W.Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54, S11–S197, 2009.

JANEWAY CA JR, TRAVERS P, WALPORT M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5 ed. New York: Garland Science;. Diseases of hypersensitivity. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27136/>, 2001.

JAYANARAYANAN, S, S SMIJIN, K T PEEYUSH, T R ANJU, AND C S PAULOSE. “NMDA and AMPA Receptor Mediated Excitotoxicity in Cerebral Cortex of Streptozotocin Induced Diabetic Rat: Ameliorating Effects of Curcumin.” *Chemico-Biological Interactions* 201 (1-3): 39–48. doi:10.1016/j.cbi.2012.11.024 , 2013.

JÚNIOR, D. M.;ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W.S.D.,CRUVINEL, W. D. M.; ANDRADE,L. E. C., SILVA, N. P. D.fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B.Sistema Imunitário – Parte II, *Revista Brasileira de Reumatologia.*, Aspectos moleculares e celulares da imunidade inata.,50(5):552-80, 2010

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. Histologia Básica. 9ª ed. Editora Guanabara Koogan., p. 151 e 223., 1999.

KIMBER, I., BETTS, C.J., DEARMAN, R.J., Assessment of the allergenic potential of proteins. *Toxicol. Lett.* 140–141, 297–302, 2003

KLEBER-JANKE, TAMARA, RETO CRAMERI, ULRICH APPENZELLER, MAX SCHLAAK, WOLF MEINHARD BECKER. “Selective Cloning of Peanut Allergens, Including Profilin and 2S Albumins, by Phage Display Technology.” *International Archives of Allergy and Immunology* 119 (4): 265–74. doi:10.1159/000024203, 1999.

KUMAR, R.K., HERBERT, C., FOSTER, P.S. The “classical” ovalbumin 10. Challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets.*9:485-494., 2008.

LADICS, G.S., KNIPPELS, L.M., PENNINKS, A.H., BANNON, G.A., GOODMAN, R.E., HEROQUET GUICHENEY, C., Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56 (2), 212–224, 2010.

LEVINSON, W. *Microbiologia Médica e Imunologia* , 12ª Ed., Editora: Bookman p. 580-588, 2014.

LI, S.S.L., LIN, T.T.S., FORD, M.D. Isolation and characterization of a lowmolecular weight seed protein from *Ricinuscommunis*. *BiochimicaetBiophysica, Acta.* 492: 364-369.,1977.

LICHTENSTEIN, L.M. Allergy and the immune System. *Scientific American*, 85-93, 1993.

LIMA, R.L.S., SEVERINO, L.S., SAMPAIO, L.R., SOFIATTI, V., GOMES, J.A., BELTRÃO, N.E.M. Blends of castor meal and castor husks for optimized use as organic fertilizer. *Ind. Crops Prod.* 33, 364–368, 2011.

LORENZI, H. *Plantas Tóxicas: Estudo de Fitotaxologia Química de Plantas Brasileiras.* 1 ed. São Paulo. Plantarum, 256p., 2011.

LUCAE S, SCHMID-GRENDELMEIER P, WUTHRICH B, KRAFT D, VALENTA R, LINHART B. IgE responses to exogenous and endogenous allergens in atopic dermatitis patients under long-term systemic cyclosporine A treatment. *Allergy*; DOI: 10.1111/all.12711, 2015

MACHADO, O.L.T.; MARCONDES, J.A.; SOUZA-SILVA, F. DE; HANSEN, RIBEIRO, P.D.; VERÍSSIMO, M.; KANASHIRO, M.; KIPNIS, T.L.; DA SILVA J.R., DOS SANTOS, M.F., COSTA E SILVA, M.C. Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinuscommunis* seeds. *Allergologie*26: 45-51, 2003.

MACHADO, O.L.T.; SILVA, J.G. An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is part of the albumin precursor predicted by c-DNA data. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25: 567-582, 1992.

MACIEL, F.M.; LABERTY, M.A.; OLIVEIRA, N.D.; FELIX, S.P.; SOARES, A.M.S.; VERÍCIMO, M.A. E MACHADO, O.L.T. A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties. *Peptides*. 30:2103-2107, 2009.

MATSUO, HIROAKI, TOMOHARU YOKOOJI, AND TAKANORI TAOGOSHI. "Allergology International Common Food Allergens and Their IgE-Binding Epitopes." *Allergology International* 64 (4). Elsevier B.V: 332–43. doi:10.1016/j.alit.2015.06.009, 2015.

MAYERHOFFER, R.D.O. Identificação de peptídeos alergênicos de Albumina 2S de *Ricinus communis* (Mamona). **Dissertação de mestrado** em Biociências e Biotecnologia –Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil , 2004.

MENÉNDEZ-ARIAS, L, I MONEO, J DOMÍNGUEZ, R RODRÍGUEZ., "Primary Structure of the Major Allergen of Yellow Mustard (*Sinapis Alba* L.) Seed, Sin a I." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 177 (1): 159–66. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14357.x, 1988.

MONSALVE, R I, M A GONZALEZ DE LA PEÑA, L MENENDEZ-ARIAS, C LOPEZ-OTIN, M VILLALBA, R RODRIGUEZ. "Characterization of a New Oriental-Mustard (*Brassica Juncea*) Allergen, Bra J IE: Detection of an Allergenic Epitope." *The Biochemical Journal* 293 ( Pt 3: 625–32. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1134412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.>, 1993.

MONTORO J, SASTRE J, BARTRA J, DEL CUVILLO A, DÁVILA I, JÁUREGUI I, Effect of H1 antihistamines upon the central nervous system. *J Investig Allergol Clin Immunol.*;16 Suppl 1:24-8., 2006.

MORALES-VILLAGRÁN, A., TAPIA, R. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat estriado in vivo. *Neurochem Int.* an;28(1):35-40, 1996.

MORENO, F JAVIER, ALFONSO CLEMENTE - "2S Albumin Storage Proteins: What Makes Them Food Allergens?" *The Open Biochemistry Journal* 2: 16–28. doi:10.2174/1874091X00802010016, 2008.

MURRAY PATRICK, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A PFALLER, *Microbiologia Médica*. 7 ed., Elsevier Brasil, p. 888, 2015

NAKAMURA, R., TESHIMA, R. Proteomics-based allergen analysis in plants. *Journal of proteomics* 93, 40-49, 2013.

NIEDERBERGER, V., Allergen-specific immunotherapy, *Immunology*, 122 (2), pp. 129-131, doi: 10.1016/j.imlet.2008.11.012, 2009.

NIELSEN BW, LIND P, HANSEN B, REIMERT CM, NANSEN P, SCHIOTZ PO. Immune responses to nematode exoantigens: sensitizing antibodies and basophil histamine release. *Allergy*. 1994;49: 427-35.

NOWAK-WE, ANNA, E HUGH A SAMPSON. "Future Therapies for Food Allergies," 558–73. doi:10.1016/j.jaci.2010.12.1098, 2013.

OGUNNIYI, D.S. Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresource Technology*. Vol.97,pp. 1086–1091, ISSN: 0960-8524 2006.,

OZDEMIR, CEVDET, UMUT CAN KUCUKSEZER, MÜBECCEL AKDIS, AND CEZMI A. AKDIS., "Mechanisms of Aeroallergen Immunotherapy." *Immunology and Allergy Clinics of North America* 36 (1): 71–86. doi:10.1016/j.iac.2015.08.003, 2016.

PARHAM, Peter. *O sistema imune*. 3. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2011.

PANTOJA-UCEDA, D.; SHEWRY, P.R.; BRUIX, M.; TATHAN, A.S.; SANTORO, J.; RICO, M. Solution structure of a methionine-rich 2S albumin from sunflower seeds: relationship to its allergenic and emulsifying properties. *Biochemistry*, 43: 6976-6986, 2004.

PASTORELLO, E A, C POMPEI, V PRAVETTONI, O BRENNNA, L FARIOLI, C TRAMBALIOI, A CONTI. "Lipid Transfer Proteins and 2S Albumins as Allergens." *Allergy* 56 Suppl 6 (6): 45–47. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00914., 2001.

POULSEN LK1, HUMMELSHOJ L. Triggers of IgE class switching and allergy development, DOI:10.1080/07853890701449354, 2007

RAJAN, T. V. "The Gell-Coombs Classification of Hypersensitivity Reactions: A Re-Interpretation." *Trends in Immunology* 24 (7): 376–79. doi:10.1016/S1471-4906(03)00142-X, 2003.

RASHID, A., IODICE, M. W., CARROLL, K. M., HOUSDEN, J. E. M., HUNTER, M., SABBAN, S. Assessing the role of Asp 194 in the transmembrane domains of the achain of the high-affinity receptor complex for immunoglobulin E in signal transduction. *Molecular Immunology*, 48(1–3), 128–136, 2010.

ROBOTHAN, J.M., TEUBER, S.S., SATHE, S.K. E EOUX, K.H. Linear mapping of English walnut (*Junglansregia*) major food allergen, Jug r 1. *Journal allergy Clinical Immunology*.143-149. 2002.

RUGGIERO, RAFAEL N, JANA B DE ROSS, HELENE A FACHIM, FERNANDO E PADOVAN-NETO, E CARLOS J S ROHNER. "Otr Ansmiação G Neurotr Otransmissão Glutama Lutamatér Térgica Neur Lutama Tér Gica E Plasticidade Sináptica : Aspectos Mo- Leculares Es , Clínicos Filo llog Lecular Es , c Línicos E F llo G Enéticos." *Medicina* 44 (2): 127–40, 2011.

SAMPSON, H.A. Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunology*. V. 113, p. 805-819, 2004.

SÁNCHEZ-MONGE R, SALCEDO G. Analytical methodology for assessment of food allergens: opportunities and challenges. *Biotechnol Adv*;23:415-22. 2005.

SANTANA, G.C.S., MARTINS, P.F., DE LIMA DA SILVA, N., BATISTELLA, C.B., MACIEL FILHO, R., WOLF MACIEL, M.R. Simulation and cost estimate for biodiesel production using castor oil. *Chem. Eng. Res. Des.* 88, 626–632, 2010.

SANTOS, R. F.; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. Aspectos econômicos do agronegócio da mamona. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2<sup>o</sup> ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 504p., 2007.

SAVY FILHO, A. Mamona (*Ricinus communis*). Desenvolvimento de Tecnologia de Produção. Disponível em: <http://www.googleacadêmico.com.br/cultivaresdemamona/docs>, 2007.

SAVY, A. F. Mamona tecnologia Agrícola. Campinas: EMOPI, p. 1-5, 2005.

SHARIEF, F.S.; Li, S.S. Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. *Journal of Biological Chemistry*, 257:14753-14759, 1982.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, 7:945-56, 1995.

SILVA, EC DE FREITAS. "Imunoterapia Específica Em Alergia Respiratória." *Revista Do Hospital Universitário Pedro Ernesto*, 84–92. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:IMUNOTERAPIA+E SPECÍFICA+EM+ALERGIA+RESPIRATÓRIA1>, 2008.

SILVA JR.; J.G., M.A.T.; MACHADO, O.L.T., IZUMI, C.; PANDOVAN, J.C.; CHAIT, B.T., MIZA, U.A. & GREENE, L.J. Amino acid sequence of new 2S albumin from *Ricinus communis* with is part of 29-kDa precursor protein. *Archives of biochemistry and biophysics*, 336: 10-18, 1996.

SIMPSON A, CUSTOVIC A. The role of allergen avoidance in the secondary prevention of atopic disorders. *Curr Opin Allergy Clinical Immunology*. 5:223-7, 2005.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochemistry* 150:76-86, 1985.

SOARES, F.A.A., SEGUNDO G. R. S., ALVES R. A., YNOUE L. H., RESENDE R. O. SOPELETE M.C., SILVA D. A. O., SUNG S. J., TAKETOMI E. A. Perfil de Sensibilização a alérgenos domiciliares em pacientes ambulatoriais. *Rev. Assoc Med. Bras*; 53(1): 25-8, 2007.

SPIES, J. R. Allergens. *J. Agric. Food Chem.* 22: 30-36, 1974.

SPIES, J. R., COULSON, E. J. The chemistry of allergens VIII. Isolation and properties of an active protein-polysaccharidic fraction, CB-1A, from castor bean. *Journal of American Chemical Society*, 65: 1720-1725, 1943.

SYNTICHAKI, P., TAVERNARAKIS, N. ,The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 4, 672-684., 2003.

THORPE, S.C.; KEMEDY, D.M.; PANZANI, R.C.; MC GULR, B.; LORD, M. Allergy to castor bean II - Identification of the major allergens in castor bean seeds. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 82: 67-72, 1988.

TONNEL, A.B. Specific Immunotherapy and Therapeutic Strategies in Allergic Diseases. What's new? *Bull Acad Natl Med*, v. 189, n.7, p. 1475-87, 2005.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON J. Electrophoretic Transfer of proteins from Polyacrylamide gels to Nitrocelulose Sheets: Procedure and Some Applications. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 4350-4354, 1979.

VALENTA, R.; FERREIRA, F.; FOCKE-TEJKI, M. From allergen genes to allergy vaccines. *Rev. Immunol.* 28: 211–241., 2010.

VALENTA, R.; STEINBERGUER, P.; DUCHÊNE, M.; DIETRICH. Immunological and structural similarities among allergens: Prerequisite for specific and component-based therapy of allergy. *Immunology and Cell Biology*, 74:187-194, 1996.

VIEIRA, M.R. Desgranulação de mastócitos por isoformas de albumina 2S de sementes de *R. communis*. **Monografia** - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil, 2002.

VIEIRA F.A.M. Novas práticas agropastoris estão influenciando a relação meio ambiente/polinose no sul do Brasil, *Rev Bras Alerg Immunopatol*; 26(1):37-8, 2003.

WOLFF, N., U. COGAN, A. ADMON, I. DALAL, Y. KATZ, N. HODOS, N. KARIN, AND S. YANNAI. "Allergy to Sesame in Humans Is Associated Primarily with IgE Antibody to a 14 kDa 2S Albumin Precursor." *Food and Chemical Toxicology* 41 (8): 1165–74. doi:10.1016/S0278-6915(03)00107-8, 2003.

WOODFOLK, JUDITH A, SCOTT P COMMINS, ALEXANDER J SCHUYLER, ELIZABETH A ERWIN, THOMAS A E PLATTS-MILLS. "Allergology International Allergens , Sources , Particles , and Molecules : Why Do We Make IgE Responses ?" *Allergology International* 64 (4). Elsevier B.V: 295–303. doi:10.1016/j.alit.2015.06.001, 2015.

XIANG, P. *et al.*, Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E – binding G2a and peanut Ara h 3-glycinims. *Archives of biochemistry and biofhisis*, V.408, n.1, p.51-57, 2002.



YERNOOL, D., O. BOUDKER, Y. JIN, E. GOUAUX. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431: 811-818. 15483603, 2004

YOULE, R.J., HUANG, A.H.C. Evidence that Castor Bean allergens are Albumin storage proteins in protein bodies of castor bean. *Plant Physiol*, 61: 1040-1042, 1978.

YU, Y., ZHANG, H., WANG, W., & WANG, S. Selective adsorbent for the removal of immunoglobulin E in bronchial asthma. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 36(1), 63–73, 2008.

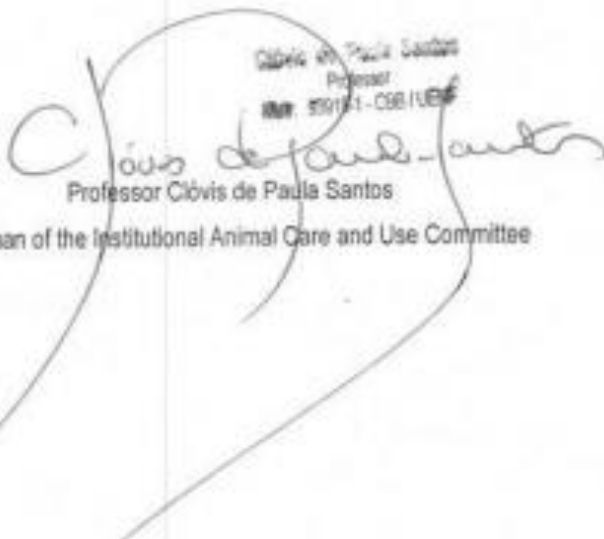
ZHAO, Z., BALDO, B. A., O'BRIEN, R. M., & PLOMLEY, R. F. Reaction with and fine structural recognition of polyamines by human IgE antibodies. *Molecular Immunology*, 37, 233–240, 2000.

## APÊNDICE

## **ANEXOS**

## CERTIFICATION

We certify that the Protocol nº 112, entitled "CHARACTERIZATION OF ALLERGENIC PROTEINS FROM OLEAGINOUS" under the responsibility of Dr Olga Lima Tavares Machado, Center for Bioscience and Biotechnology /UENF is consistent with the ethical principles for animal experimentation adopted by Brazilian Society of Laboratory Animal Science / Brazilian College of Animal Experimentation (SBCAL / COBEA) and Federal law number 11,794. It is therefore approved and authorized. This program is licensed in this format and is valid until 21/12/2014.

  
Clóvis de Paula Santos  
Professor  
CBE 1101/11 - COBEA/UENF  
Professor Clóvis de Paula Santos  
Chairman of the Institutional Animal Care and Use Committee