



EXPRESSÃO HETERÓLOGA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
IMUNOLÓGICA DE Ric c 3 mutante, PROTEÍNA DERIVADA DE UM
IMPORTANTE ALÉRGENO DE *Ricinus communis*

MARIANA GIAROLA BENEDITO BARTHOLAZZI

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Campos dos Goytacazes, RJ

Dezembro – 2022

EXPRESSÃO HETERÓLOGA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
IMUNOLÓGICA DE Ric c 3 mutante, PROTEÍNA DERIVADA DE UM
IMPORTANTE ALÉRGENO DE *Ricinus communis*

MARIANA GIAROLA BENEDITO BARTHOLAZZI

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Campos dos Goytacazes, RJ

Dezembro - 2022

EXPRESSÃO HETERÓLOGA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO
IMUNOLÓGICA DE Ric c 3 mutante, PROTEÍNA DERIVADA DE UM
IMPORTANTE ALÉRGENO DE *Ricinus communis*

MARIANA GIAROLA BENEDITO BARTHOLAZZI

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em: 15 / 12 / 2022

Comissão examinadora:

Adriana F. Mercadante

Dr^a Adriana Frohlich Mercadante

Ana Eliza Zeraik

Dr^a Ana Eliza Zeraik

Érica de Oliveira Mello

Dr^a Érica de Oliveira Mello

Olga L.F. Machado

Dr^a. Olga Lima Tavares Machado – UENF (Orientadora)

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios:

- Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, sob a orientação da Dra. Olga Lima Tavares Machado.
- Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, sob a supervisão do Dr. André de Oliveira Carvalho.
- Laboratório de Imunologia Comparada (LIC), no Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná – UFPR, sob a supervisão do Dr. Breno Castello Branco Beirão.

Financiamentos:

- FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
- CNPq (Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e tecnológico)

“Adquire a sabedoria, adquiere a inteligência e não te esqueças nem te apartes das palavras da minha boca.”

Provérbios 4:5

Dedico este trabalho ao meu esposo Edvaldo Junior e minhas filhas, Elis e Cecília. Eles foram a minha motivação para a conclusão dessa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que com toda sua Glória e Majestade, cuidou de mim e de cada etapa desse trabalho nesses últimos anos. Obrigada Senhor, pois tudo que tenho, sou e vier a ser vem de Ti! A Ele toda a Honra, Glória e Louvor!

A minha orientadora, Dr^a Olga Lima Tavares Machado, não só pela orientação, mas também pelo carinho, compreensão e braços abertos em momentos tão importantes da minha vida que aconteceram no decorrer do doutoramento, como as duas gravidezes e a minha mudança de cidade. Além do seu estímulo e confiança para a execução dessa pesquisa. Sua dedicação e amor pelo conhecimento são uma inspiração!

Ao Dr. André de Oliveira Carvalho, por ser mais que um supervisor e colaborador nas etapas de Biologia Molecular, pois muitas vezes se mostrou um amigo, sofrendo comigo por cada resultado sem êxito, não me deixando desanimar nas diversas tentativas, me aconselhando, ouvindo e até mesmo colocando a “mão na massa” algumas vezes. Obrigada pela sua atenção e ensino!

Ao Dr. Breno Castello Branco Beirão, que abriu as portas de seu laboratório e me cedeu tudo que era necessário para a conclusão dessa pesquisa. Confiando em mim e nesse trabalho, ele não mediu esforços para me ajudar, além de ter compartilhado muito de seu conhecimento em Biologia Molecular e Imunologia, me ensinando tudo com muita dedicação. Obrigada!

A todos os alunos e demais professores do Laboratório de Imunologia Comparada da UFPR, que me receberam e me ajudaram em tudo o que precisei durante o tempo que passei por lá. Mas em especial, agradeço a aluna de IC Eloise de Souza Mello, por ter me acompanhado em etapas importantes dessa pesquisa, como no primeiro resultado positivo que obtivemos, além de ter me ajudado diretamente nas etapas de imunização.

As queridas amigas de Laboratório! Jucélia, Débora, Francianne, Caroline, Tatiana, Raquel e Luciana como vocês são especiais! Nesses dois anos encontrando vocês apenas de forma *on-line*, pude perceber ainda mais o quanto são importantes na minha vida. Os dias de trabalho em um laboratório longe de vocês não são os mesmos. Sou grata e feliz por poder chama-las de amigas! Muito

especialmente quero agradecer a Tatiana, que me ajudou na autoria do capítulo de um livro e também de um artigo.

Aos amigos, funcionários e professores, pelas amizades, ensinamentos e companheirismo no meu dia a dia tanto na UENF quanto na UFPR.

Preciso agradecer ainda meu esposo, Edvaldo Junior, que me incentivou a ingressar no doutorado, mesmo já conhecendo todas as dificuldades que já enfrentávamos. Obrigada por ser um marido compreensivo, nas diversas vezes que precisei me ausentar, e obrigada também por ser um pai tão presente e amoroso, cuidando das nossas filhas para que eu pudesse ir para o laboratório ou até mesmo ficasse estudando em casa... E mais uma vez, obrigada por viver comigo esse sonho! Sem seu apoio eu não teria conseguido. Te amo!

Minhas filhas, Elis e Cecília que chegaram durante o doutoramento. Vocês me motivaram a não parar! Mesmo nos dias mais difíceis, pensar em vocês me deu força.

Aos meus pais, Andréa e Átila e minhas irmãs, Lara e Rebecca, que sempre acreditaram que eu conseguiria! E a todos da família, que com alegria torceram por essa conquista!

Agradeço também aos meus amigos pelo carinho, amizade e cada palavra de apoio! Em especial quero agradecer minha amiga Natália, que me fortaleceu com suas orações e ombro amigo, sempre se preocupando comigo e com o andamento da pesquisa. Sua amizade é um presente de Deus para mim.

Aos queridos amigos da base de Perspectivas que são nossa família em Curitiba. E a todos os meus irmãos em Cristo, que me sustentaram com suas orações! Seria injusto tentar citar nomes, acabaria esquecendo alguém, mas sei o quanto vocês se preocupavam e torciam por mim! Sou grata a Deus pela vida de vocês!

Enfim, a todos que tornaram isso possível, direta ou indiretamente.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A prevalência das doenças alérgicas tem aumentado mundialmente. Atualmente, o tratamento para alergias em geral é a Imunoterapia alérgeno específica (AIT), utilizando extratos naturais alergênicos, no entanto, tem-se observado que o uso desses extratos desencadeia reações alérgicas pelos contaminantes ali presentes, apresentando contra-indicações. A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa que encontra condições apropriadas para o seu desenvolvimento no Brasil e diversos estudos vem sendo realizados para ampliar o seu uso. Os principais alérgenos presentes na mamoneira são isoformas de proteínas pertencentes à classe das albuminas 2S (Ric c 1 e Ric c 3). Embasados nos conhecimentos das estruturas de Ric c 1 e Ric c 3 e na determinação de epítomos ligantes de IgE, neste trabalho produzimos uma proteína mutante recombinante, mrRic c 3, hipoalergênica, empregando técnicas de DNA recombinante. A alergenicidade de mrRic c 3 foi avaliada por ensaios de desgranulação de mastócitos isolados de ratos Wistar e imunização de camundongos Balb/c, avaliando a produção de IgE, IgG1 e IgG total. Nossos resultados demonstram que mrRic c 3 apresentou um percentual de desgranulação de mastócitos próximo ao verificado no controle negativo e que a imunização de camundongos com mrRic c 3 apresentou níveis mais baixos de IgE e IgG1 do que o grupo tratado com a proteína sem mutações. Concluímos assim, que nossos resultados demonstraram que esta estratégia para a produção de alérgenos mutantes hipoalergênicos (mrRic c 3) pode ser um passo importante no desenvolvimento de novas estratégias para AIT.

Palavras-chave: Albuminas 2S, Ric c 3, Recombinante Hipoalergênico, AIT

ABSTRACT

The prevalence of allergic diseases has increased worldwide. Currently, the treatment for allergies in general is Allergen Specific Immunotherapy (AIT), using natural allergenic extracts, however, it has been observed that the use of these extracts triggers allergic reactions by the contaminants present there, presenting contraindications. Castor bean (*Ricinus communis* L.) is an oilseed that finds appropriate conditions for its development in Brazil and several studies have been carried out to expand its use. The main allergens present in castor bean are isoforms of proteins belonging to the 2S albumin class (Ric c 1 and Ric c 3). Based on the knowledge of the structures of Ric c 1 and Ric c 3 and on the determination of IgE binding epitopes, in this work we produced a recombinant mutant protein, mrRic c 3, hypoallergenic, using recombinant DNA techniques. The allergenicity of mrRic c 3 was evaluated by degranulation assays of mast cells isolated from Wistar rats and immunization of Balb/c mice, evaluating the production of IgE, IgG1 and total IgG. Our results demonstrate that mrRic c 3 presented a percentage of mast cell degranulation close to that observed in the negative control and that the immunization of mice with mrRic c 3 presented lower levels of IgE and IgG1 than the group treated with the protein without mutations. We conclude that our results demonstrate that this strategy for the production of hypoallergenic mutant allergens (mrRic c 3) can be an important step in the development of new strategies for AIT.

Keywords: Albumins 2S, Ric c 3, Recombinant Hypoallergenic, AIT

Lista de Figuras

Figura 1: Imagem representativa de um epítopo.....	18
Figura 2: Estruturas tridimensionais teóricas dos epítomos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3.....	19
Figura 3: Estrutura da Ric c 3 antes e após a mutação.....	21
Figura 4: Eventos observados em uma reação de Hipersensibilidade do tipo I..	23
Figura 5: Mecanismo de Ação dos anti-histamínicos.	25
Figura 6: Desenvolvimento de tolerância a alérgenos através de imunoterapia alérgeno-específica..	29
Figura 7: Sequência gênica e proteica de mRic c 3..	35
Figura 8: Sequência dos iniciadores usados para a ligação ao vetor pET-32 EK/LIC.	38
Figura 9: Detalhamento da região do sítio de policlonagem do vetor pET-32 EK/LIC.	39
Figura 10: Visualização eletroforética da indução da expressão de nrRic c 3 e mrRic c 3 com 1mM de IPTG por SDS-PAGE.....	47
Figura 11: Análise da indução da expressão por <i>Western Blotting</i> após etapa de purificação em coluna Ni-NTA utilizando anticorpo primário anti-His.	47
Figura 12: Perfil de anticorpos produzidos após imunização com nrRic c 3 e mrRic c 3..	48
Figura 13: Ensaio de desgranulação de mastócitos.	49

Lista de Esquemas

Esquema 1: Protocolo de imunização. As setas representam os dias de imunização e o ponto representa o dia da coleta de sangue. Fonte: própria autoria. 45

Lista de Abreviaturas e Siglas

APCs <i>Presenting Cells</i>	Células apresentadoras de antígenos – do inglês <i>Antigen</i>
ASBAI	Associação Brasileira de Alergia e Imunologia
AIT <i>immunotherapy</i>	Imunoterapia alérgeno-específica – do inglês <i>Allergen specific</i>
Breg	Células B regularórias
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O. ₆₀₀	Densidade óptica em 600 nm
E. coli	Bactéria <i>Escherichia coli</i>
ELISA <i>Immunsorbent Assay</i>	Ensaio de Imunoabsorção enzimática - do inglês <i>Enzyme-Linked</i>
FcεRI	Receptor de alta afinidade
FDA	Food and Drug Administration
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
H ₂ R	Receptor de histamina 2
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-25	Interleucina 25
IL-33	Interleucina 33
IPTG	Isopropill-β-D-1-tiogalactopiranosida
kDa	Quilodalton
Meio LB	Luria Bertani
mrRic c 3	Proteína recombinante mutante de Ric c 3

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nrRic c 3	Proteína recombinante natural de Ric c 3
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBST	Tampão Fosfato Salino + Tween
PCR <i>reaction</i>	Reação em cadeia da polimerase – do inglês <i>polymerase chain</i>
Ric c 1	Alérgeno 1 de <i>Ricinus communis</i>
Ric c 3	Alérgeno 3 de <i>Ricinus communis</i>
RPM	Rotações por minuto
SCIT	Imunoterapias subcutâneas
SFB	Soro Fetal Bovino
SLIT	Imunoterapias sublinguais
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
T _H	Linfócitos T helper
T _H 1	Linfócitos T helper 1
T _H 2	Linfócitos T helper 2
TMB	Tetrametilbenzidina
Treg	Células T regulatórias
TSLP	Linfopoiatina do estroma tímico

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Albuminas 2S de <i>Ricinus communis</i>	17
1.2. Processo de desencadeamento da alergia	21
1.3. Abordagens terapêuticas para o tratamento da alergia	23
1.3.1. Anti-Histamínicos.....	24
1.3.2. Anticorpos monoclonais anti-IgE.....	26
1.3.3. Imunoterapia alérgeno-específica.....	27
1.4. Novas abordagens no desenvolvimento de AIT	30
1.4.1. Derivados recombinantes hipoalergênicos.....	31
2. Objetivo	33
2.1. Objetivos específicos	33
A) Produção de uma proteína hipoalergênica derivada de Ric c 3	33
B) Avaliar a resposta imunológica desencadeada por Ric c 3 recombinante natural e mutante	33
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Materiais Biológicos	33
3.2. Desenho do gene sintético de Ric c 3 mutante	34
3.2.1. Sequência codificante de Ric c 3 nativa	35
3.3. Produção de células competentes de <i>E. coli</i> (linhagem Nova Blue)	36
3.4. Transformação da cepa de clonagem Nova Blue com vetor pMA contendo mRic c 3	36
3.5. Extração e digestão plasmidial de <i>E. coli</i> – Nova Blue transformadas com mRic c 3	37
3.6. Amplificação gênica e clonagem em vetor de expressão pET-32 EK-LIC	38
3.7. Transformação bacteriana em cepa de superexpressão – <i>E. coli</i> linhagem Rosetta-gami	40
3.8. Indução da superexpressão de Ric c 3 nativa e mutante recombinante (nr Ric c 3 e mrRic c 3)	41
3.9. Avaliação da expressão das proteínas recombinantes	42
3.10. Obtenção das proteínas expressas	42
3.10.1. Lise celular.....	42
3.10.2. Cromatografia de afinidade (níquel-agarose)	43
3.10.3. Diálise.....	43
3.11. Ensaio Biológicos	44
3.11.1. Imunização dos animais	44

3.11.2. Obtenção do soro	44
3.12. Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA)	45
3.13. Ensaio de Desgranulação de mastócitos	45
4. Resultados	46
4.1. Indução da expressão de nrRic c 3 e mrRic c 3	46
4.2. Avaliação do perfil de anticorpos produzidos no processo de Imunização em camundongos Black-C57	48
4.3. Análise da atividade alergênica.....	49
5. Discussão	50
6. Conclusão	55
7. Anexos	56
8. Apêndices.....	59
9. Referências Bibliográficas.....	60

1. Introdução

1.1. Albuminas 2S de *Ricinus communis*

Proteínas de reservas de plantas dicotiledôneas, as Albuminas 2S são caracterizadas como os principais alérgenos da mamona (*Ricinus communis*), podendo ser encontradas no pólen, frutos e sementes. Em sementes, as albuminas 2S são encontradas em corpos proteicos sendo mobilizadas durante a germinação (Youle & Huang, 1978; Irwin et al., 1990).

A presença de alérgenos no pólen de mamona pode contribuir para o desencadeamento de reações alérgicas nos plantadores e manipuladores desta oleaginosa através da sua inalação, através da inalação do pó durante o preparo da torta da mamona e pela manipulação das sementes durante a extração do óleo. A população que vive próxima de plantações de mamona também é exposta às proteínas alergênicas e podem desenvolver reações alérgicas. A alergia a Albumina 2S de mamona também foi observada em trabalhadores de diversos setores que utilizavam como matéria-prima o óleo dessa planta (Garcia-Gonzalez et al., 1999).

As Albuminas 2S são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, como um precursor proteico de alta massa molecular. Este precursor sofre processamento pós-traducional, por endopeptidases e carboxipeptidases, perdendo alguns fragmentos peptídicos para assim dar origem as isoformas. Essas isoformas foram descritas como Ric c 1 e Ric c 3 e são sintetizadas em um único precursor com 237 resíduos de aminoácidos, cerca de 29 kDa (Youle & Huang, 1978; Irwin et al., 1990; Breiteneder & Mills, 2005).

Ric c 1 apresenta baixa massa molecular, alto teor de glutamina e é composta por duas cadeias polipeptídicas ligadas por ponte dissulfeto, uma cadeia leve (34 resíduos de aminoácidos) e outra cadeia pesada (61 resíduos). A isoforma Ric c 3 também apresenta baixa massa molecular, um alto teor de glutamina e duas cadeias polipeptídicas ligadas por duas pontes dissulfeto, sendo 41 resíduos de aminoácidos na cadeia leve e 67 resíduos na cadeia pesada (da Silva et al., 1996).

As isoformas Ric c 1 e Ric c 3 são classificadas na superfamília das Prolaminas, que tem como característica um esqueleto conservado contendo 8 resíduos de cisteínas em sua sequência (C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C)

formando 4 pontes dissulfeto. A presença do “*motif*” CC e CXC no esqueleto conservado, não é comum, facilitando a identificação dos membros dessa superfamília (Kreis et al., 1985; Shewry et al., 2002).

Nessas isoformas foram identificados seis epítomos responsáveis pelo desencadeamento da alergia, sendo dois desses encontrados em Ric c 1 e quatro em Ric c 3. Epítomos são regiões de interação do alérgeno com anticorpos IgEs, estes podem ser conformacionais, resultantes do arranjo estrutural da molécula ou contínuos (lineares), onde a sequência primária contínua pode desencadear a resposta alérgica no indivíduo previamente sensibilizado. Apesar da especificidade de ligação entre o epítopo e a IgE, podem ocorrer fenômenos de reações cruzadas com outros alérgenos que possuem epítomos multivalentes (Bufe, 2001; Felix, 2007; Ivanciuc et al., 2009) (Figura 1).

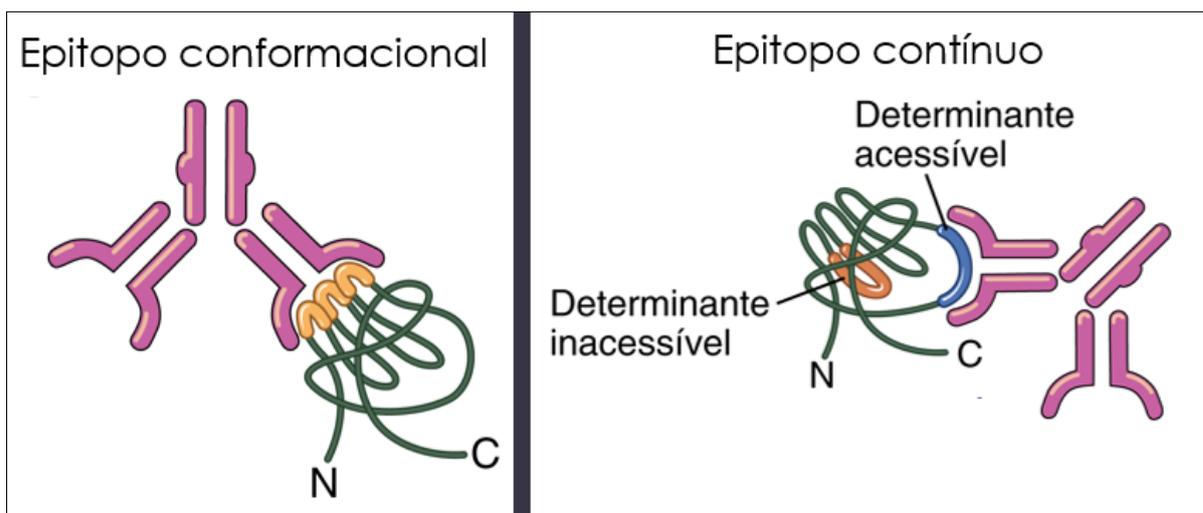


Figura 1: Imagem representativa de um epítopo conformacional interagindo com a molécula de IgE (à esquerda) e de um epítopo contínuo também interagindo com a IgE, destacando a região de interação entre estes (à direita). Extraído e adaptado de Abbas et al., 2015.

O mapeamento de epítomos lineares através de peptídeos sintéticos, tem se mostrado uma ferramenta importante na identificação dos sítios de ligação do alérgeno à IgE (Tanabe, 2007).

Os epítomos ligantes de IgE responsáveis pelo desencadeamento da alergia encontrados nas isoformas Ric c 1 e Ric c 3 foram descritos como epítomos contínuos (ou lineares), pois mesmo após serem submetidas à desnaturação, eles se mostraram capazes de desencadear a desgranulação de mastócitos (Felix et al., 2008).

Além disso, verificou-se nos epítomos dessas duas isoformas, que para ocorrer a ligação com as IgEs presentes na membrana dos mastócitos e/ou basófilos, é necessário que haja 2 resíduos de ácidos glutâmicos (E) a uma distância de no máximo 12 resíduos entre eles, assim levando ao processo de desgranulação destas células e desencadeando os sintomas da alergia, suportando a hipótese de que os grupamentos carboxílicos laterais destas cadeias podem ser importantes na interação com as moléculas de IgE (Figura 2) (Felix, 2007; Deus-de-Oliveira et al., 2011).

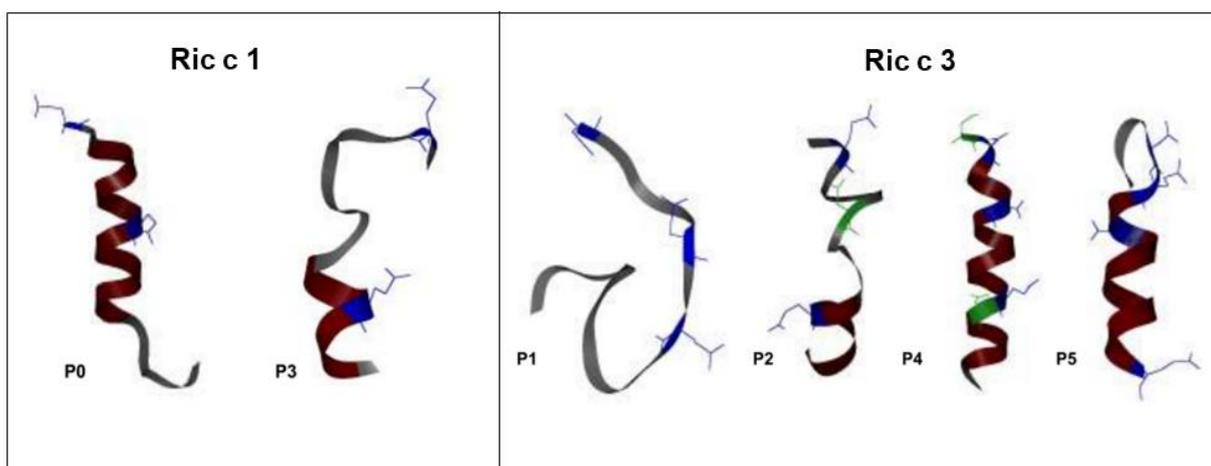


Figura 2: Estruturas tridimensionais teóricas dos epítomos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3. Na estrutura dos epítomos estão destacados em azul os resíduos de ácido glutâmico e em verde os resíduos de ácido aspártico. Extraído e adaptado de Nascimento (2009).

Diversas plantas possuem albuminas 2S e muitos alérgenos semelhantes aos da classe das albuminas 2S podem ser encontrados em sementes, tais como no amendoim, na castanha, no gergelim, no girassol, na mostarda, nas nozes e na soja. A similaridade estrutural das proteínas pode promover reações cruzadas entre diferentes IgEs e tais alérgenos (H. Breiteneder & Radauer, 2004).

Além das sementes, algumas oleaginosas também apresentam alérgenos da classe das albuminas 2S no pólen, com isso, o plantio dessas plantas pode promover processos alérgicos em indivíduos atópicos, através da dispersão de seus alérgenos no ar. Dentre elas estão: a soja (*Glycine max* L.), o girassol (*Helianthus annus* L.), o algodão (*Gossypium spp.*), a colza (*Brassica napus* L.), a mamona (*Ricinus communis* L.) e o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) (Oliveira et al., 2014).

Estudo “*in vitro*” utilizando mastócitos sensibilizados com soro rico em IgE anti-albuminas 2S de mamona, demonstrou que esses podem desencadear a desgranulação dessas células quando expostos a alérgenos inaláveis, como poeira, fungos e tabaco e, também quando expostos a componentes alergênicos presentes em alimentos como camarão, peixe, glúten, trigo, soja, amendoim e milho, verificando a existência de reação cruzada entre eles (Felix et al., 2008; Deus-de-Oliveira et al., 2011a).

O reconhecimento de vários alérgenos de diferentes fontes dificulta a precisão do diagnóstico clínico para qual alérgeno o indivíduo foi sensibilizado. Muitas análises de proteínas alergênicas identificaram semelhanças estruturais na sequência de aminoácidos reforçando as reações cruzadas, porém ainda se faz necessário obter mais informações para estabelecer uma relação entre a estrutura da proteína e os sintomas clínicos (Mueller, 2017).

Para que ocorra reatividade cruzada entre alérgenos é necessário haver de 35% a 70% de similaridade de aminoácidos na sequência proteica. Esse dado pode ser observado na maioria das reações desencadeadas por alérgenos 2S, pois estas ocorrem através dos epítopos lineares compartilhados entre eles (Aalberse, 2000; Moreno & Clemente, 2008).

Através de um estudo *in silico*, Nascimento (2009) propôs a desativação teórica dos epítopos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3. A pesquisa mostrou a viabilidade em realizar mutações nos resíduos de ácidos glutâmicos (E) dos epítopos dessas isoformas, trocando por resíduos de leucina (L), tornando-as menos alergênicas e sem que isso alterasse de forma significativa as estruturas dessas proteínas (Figura 3).

Com base nesses dados, Pacheco-Soares et al., (2018), estabeleceram condições para a expressão da isoforma Ric c 1 em um sistema bacteriano utilizando *Escherichia coli* (*E. coli*), contendo as mutações nos fragmentos específicos dos epítopos alergênicos.

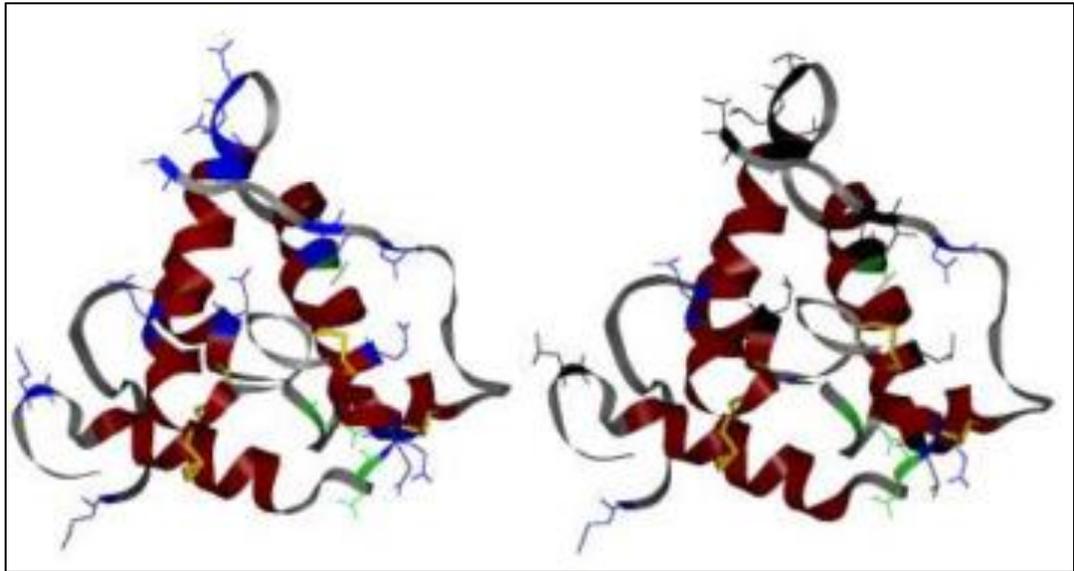


Figura 3: Estrutura da Ric c 3 antes e após a mutação. Os resíduos de ácido glutâmico estão em azul, de ácido aspártico em verde e de leucina em preto. Extraído de (Nascimento, 2009).

1.2. Processo de desencadeamento da alergia

Alergia ou hipersensibilidade do tipo I (imediate) configura-se numa reação exacerbada do sistema imunológico contra determinadas substâncias encontradas no ambiente ou nos alimentos, denominadas de alérgeno. As respostas alérgicas se manifestam de forma diferente entre os indivíduos. Como é o caso dos indivíduos atópicos, que apresentam predisposição genética a se sensibilizarem mais facilmente, desencadeando maiores títulos de IgEs no sangue, dessa forma, aumentando o reconhecimento do antígeno pelo organismo e os sintomas da alergia. Além disso, o tipo e a via de exposição ao alérgeno e consequente apresentação deste para o sistema de imune, pode desempenhar o papel do desencadeamento de reações alérgicas (Aalberse, 2000; Leung et al., 2003; Ozdemir et al., 2016).

Uma reação alérgica acontece quando um indivíduo entra em contato com algum alérgeno, através do contato com a pele, inalação ou ingestão, que ativará células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo células dendríticas, sofrendo uma clivagem proteolítica que gera fragmentos peptídicos conhecidos como epítopos de células T. Essa ativação levará a um fenótipo pró-alérgico potencializado por citocinas derivadas do epitélio - linfopietina do estroma tímico (TSLP), interleucina-33 (IL-33), IL-25, IL-4 e IL-13 de células linfoides inatas e

basófilos. Pela ativação da IL-4, as APCs apresentam o alérgeno às células “naive” T helper (T_H) para então se diferenciarem das células T_H2 (Gunawardana & Durham, 2018; Ozdemir et al., 2016).

Células T_H2 ativadas induzirão a produção de anticorpos pelos linfócitos B, através das citocinas. IL-4 e IL-13 produzidas a partir de células T_H2 ativadas, induz a troca de classe nos linfócitos B para produzirem anticorpos IgE específicos (sIgE). Anticorpos IgE são então liberados pelos plasmócitos associando-se aos receptores específicos (FcεRI) que estão presentes na superfície de mastócitos encontrados no tecido, ou de basófilos circulantes no sangue, ocorrendo assim, a primeira sensibilização (Gunawardana & Durham, 2018; Holgate & Polosa, 2008).

A resposta alérgica é observada quando houver nova exposição ao mesmo alérgeno, conhecida como segunda sensibilização ou reestimulação. Nessa etapa ocorre a ligação cruzada entre os epítopos presentes no alérgeno com as moléculas de IgE previamente fixadas na superfície dos mastócitos e basófilos, liberando seus grânulos intracelulares e sintetizando mediadores bioativos, como histaminas, proteases e citocinas. Desse processo, os sintomas e sinais de reações de hipersensibilidade do tipo I de fase aguda surgirão (Akdis, 2006; Ozdemir et al., 2016) (Figura 4).

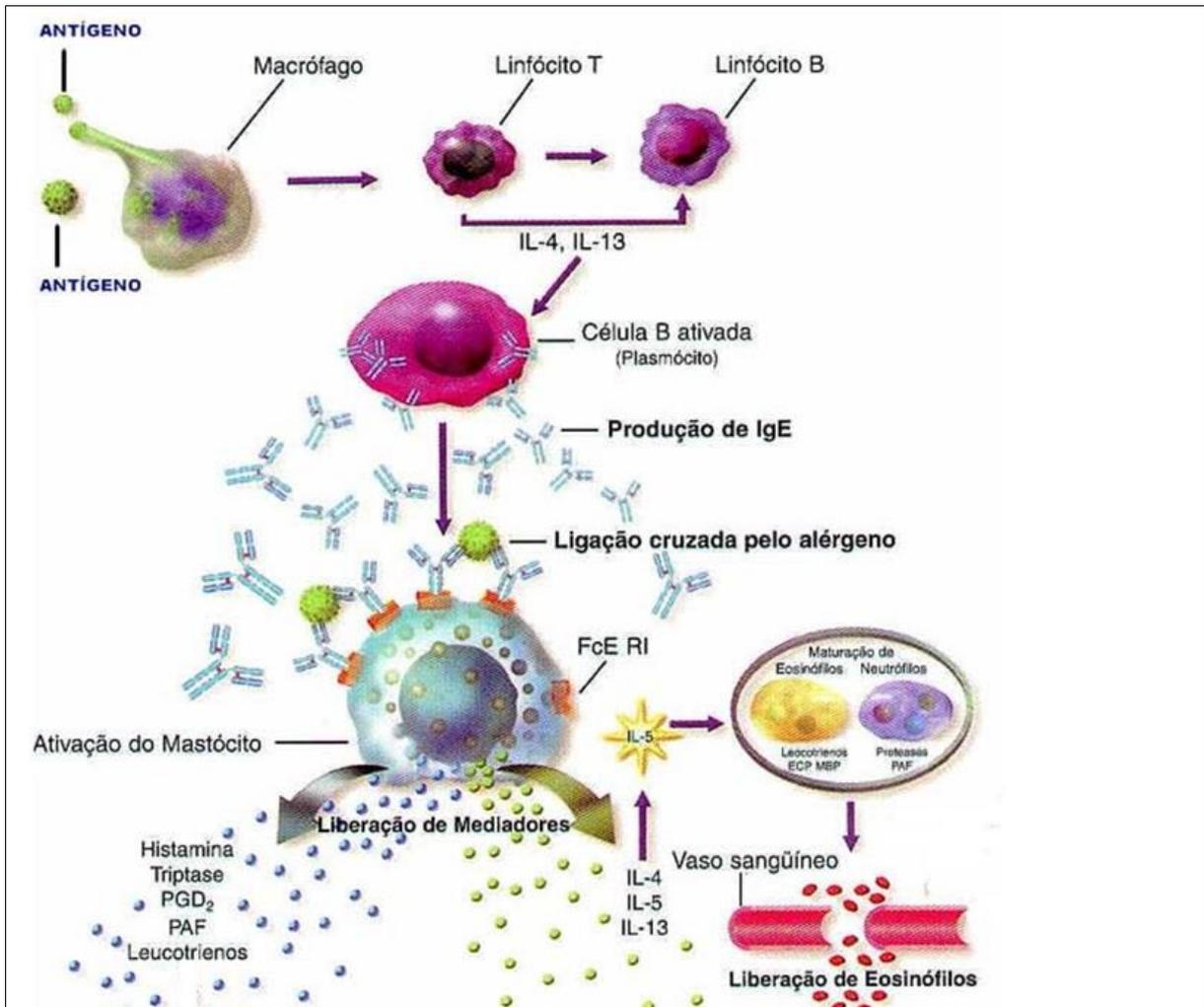


Figura 4: Eventos observados em uma reação de Hipersensibilidade do tipo I. Extraído e adaptado de Telles-Filho (2022).

1.3. Abordagens terapêuticas para o tratamento da alergia

Fatores epigenéticos, mudanças no estilo de vida da população e o aumento da disseminação de alérgenos ocasionado pelas mudanças climáticas, tem levado a um aumento na prevalência das alergias mediadas por IgE mundialmente, atingindo todas as faixas etárias. De acordo com a Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (ASBAI), só no Brasil, há aproximadamente 16 milhões de pessoas alérgicas (Stefan et al., 2017; ASBAI, 2022).

Ainda, de acordo com a ASBAI, entre os principais tipos de alergia, as mais prevalentes são as da via respiratória, como rinites, rinoconjuntivites, sinusites e asma e as alergias de pele, sendo as principais delas as dermatites atópicas e as dermatites de contato.

Com isso, nos últimos anos estratégias terapêuticas vem sendo estudadas com o intuito de desenvolver métodos mais eficazes e seguros a fim de contribuir com a prevenção, melhora ou a cura das doenças alérgicas (Navarro et al., 2019).

A gama de informações que se tem a respeito dos diferentes alérgenos vem contribuindo para uma melhor compreensão do desencadeamento das alergias, possibilitando o surgimento de novas abordagens de tratamentos e diagnósticos, e por isso, as novas tecnologias denominadas de “ômicas”, que envolvem estudos relacionados como a genômica, metabolômica, proteômica, epigenômica dentre outras, tem contribuído positivamente com a descoberta de tratamentos e diagnósticos, pois são capazes de gerar novos dados tornando possível a investigação a nível molecular dos alérgenos (Jensen & Canonica, 2017; Breiteneder et al., 2019).

Dentre as alternativas para o tratamento da alergia podemos destacar: medicamentos que visam inibir a ação da histamina, anti-inflamatórios que tem como objetivo controlar a inflamação tecidual local e o desenvolvimento de imunoterapias alérgeno-específicas (AIT) como uma medida profilática para as doenças alérgicas. Os temas em questão serão expostos nas sessões seguintes deste trabalho.

1.3.1. Anti-Histamínicos

Os medicamentos com ação antialérgica disponível hoje no mercado visam inibir da ação da histamina, bloqueando a interação dessas com seus receptores. Os anti-histamínicos estão entre os medicamentos mais usados por quem sofre de algum tipo de alergia. Esses fármacos têm a função de aliviar os sintomas alérgicos, ou seja, eles agem a partir das consequências da reação alérgica, já desencadeada no indivíduo (Wang et al., 2016).

Os anti-histamínicos atuam como agonistas inversos, competindo com a histamina e reduzindo a atividade do receptor. A ligação histamina-receptor induz uma conformação completamente ativa, enquanto a ligação do anti-histamínico produz uma conformação inativa. Dessa forma, tecidos com receptores H1 não são ativados e não produzem uma resposta alérgica (Chavez & Alva, 2022) (Figura 5).

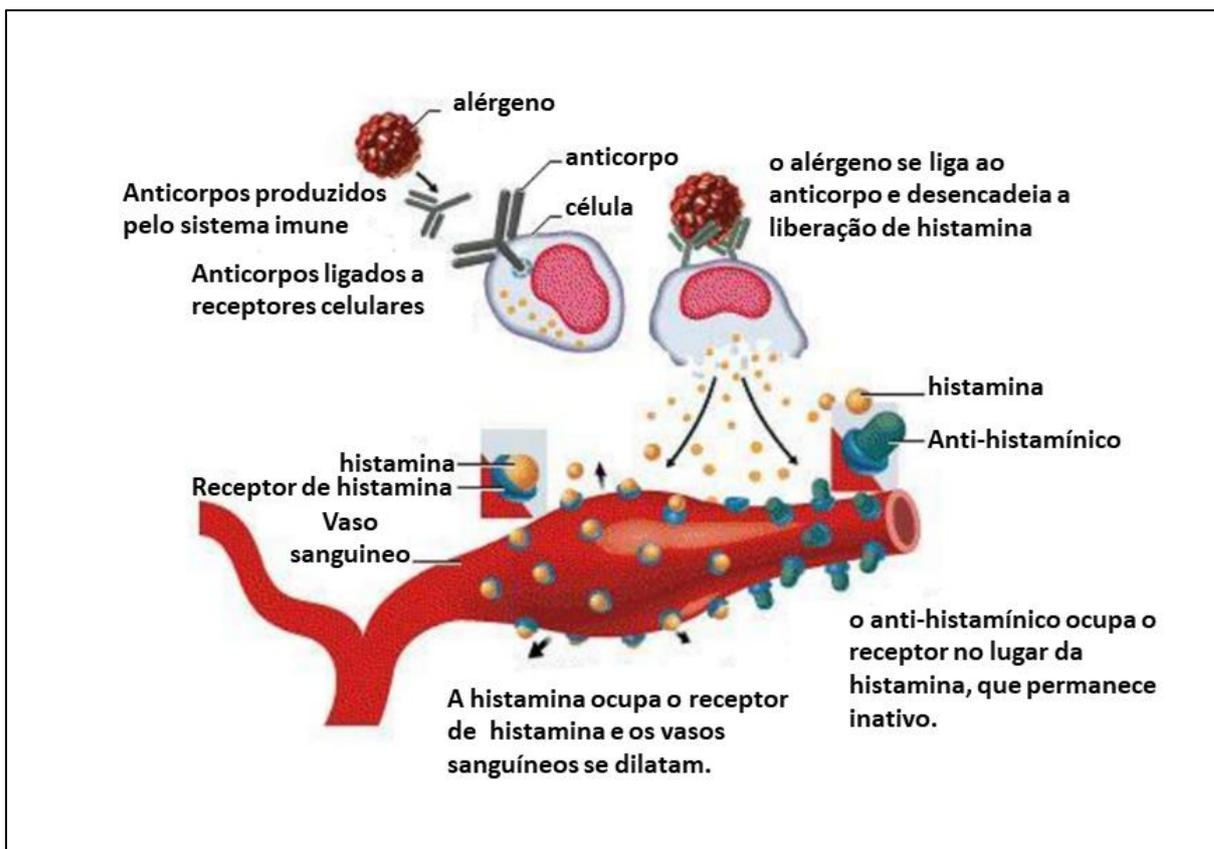


Figura 5: Mecanismo de Ação dos anti-histamínicos. Extraído e adaptado (Chavez & Alva, 2022)

Os antagonistas dos receptores H1 ou os anti-histamínicos de primeira geração podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis envolvendo o sistema nervoso central, mesmo em doses terapêuticas, devido à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e falhar na sua seletividade. Esses efeitos colaterais podem incluir sonolência, sedação e fadiga, levando a uma redução cognitiva, de memória e do desempenho psicomotor (Simons & Simons, 2008).

Com o intuito de minimizar os efeitos colaterais desses medicamentos, uma nova classe de anti-histamínicos foi desenvolvida. Os antagonistas H1 de segunda geração, que não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica com facilidade e têm maior seletividade aos receptores H1, diminuindo seus efeitos sedativos em comparação com os medicamentos de primeira geração (Church & Church, 2013).

Os medicamentos anti-histamínicos de segunda geração incluem: Cetirizina, Ebastina, Epinastina, Fexofenadina, Loratadina, Desloratadina, Levocetirizina e Rupatadina. Embora sejam considerados mais seletivos e menos causador de

efeitos adversos, alguns fármacos ainda podem causar sonolência e necessitar de mais de uma dose diária (Church & Church, 2013).

No que diz respeito ao tratamento farmacológico das alergias, cabe ao médico a prescrição com base num diagnóstico preciso e ao químico farmacêutico a responsabilidade de garantir a eficácia e a segurança farmacoterapêutica dos medicamentos. Contudo, a venda de medicamentos anti-histamínicos em estabelecimentos farmacêuticos nem sempre é obedecida dentro de padrões e isto tem levado a aquisição deste medicamento de forma irresponsável, sendo apenas uma atividade empresarial diária (Chavez & Alva, 2022).

Além disso, o tratamento com medicamentos anti-histamínicos apenas alivia os sintomas causados pelas reações alérgicas, não atuando na profilaxia ou tratamento da alergia (Iguchi et al., 2016).

1.3.2. Anticorpos monoclonais anti-IgE

Outra estratégia que vem sendo estudada é o bloqueio da interação IgE-receptor de alta afinidade. Nesta opção terapêutica a proposta é a utilização de anticorpos monoclonais anti-IgE, conhecido como Omalizumab (nome comercial: Xolair[®], Laboratório Novartis), que possui ação anti-inflamatória e diminui as respostas alérgicas. Esta terapia foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 2003 para o tratamento da asma grave mediada por IgE (Hamilton et al., 2010).

A estratégia por trás dessa terapia é inibir a interação entre a IgE e os seus receptores específicos FcεRI, apresentando algumas vantagens a serem consideradas, como a prevenção da ligação da IgE ao receptor FcεRI, diminuindo assim o número desses receptores sendo expressos e na baixa reatividade das células que participam do processo alérgico, como os mastócitos e basófilos (Blank et al., 2015).

A terapia anti-IgE baseada em Omalizumab (Xolair[®]), é usada para se ligar à IgE livre, diminuindo a IgE circulante, porém não ocorre a ligação nas IgEs fixas nas células, porque o epítipo da IgE (fragmento específico) contra o qual o Omalizumab é direcionado já está fixado nos receptores e, portanto, está oculto. Este tratamento é indicado, principalmente, no tratamento de doenças brônquicas graves como asma

e no tratamento da rinoconjuntivite alérgica. E mais recentemente, estudos estão sendo realizados para verificar a utilização de Omalizumab no tratamento de alergias alimentares, mas seu alto custo tem limitado o seu uso para esse fim (Amato, 2006; Blank et al., 2015).

Outras questões relevantes sobre este tratamento vem sendo avaliadas, já que a interrupção do uso deste anticorpo monoclonal pode levar a novas manifestações de reações adversas (Loh & Tang, 2018).

A média de vida do anticorpo monoclonal anti-IgE (Omalizumab) é curta, variando entre 1 a 4 semanas, dessa forma se faz necessária a administração repetida do medicamento, tornando-o um tratamento caro e pouco acessível, limitando seu alcance de aplicação (Ward et al., 2018).

1.3.3. Imunoterapia alérgeno-específica

O primeiro estudo propondo a Imunoterapia alérgeno-específica (AIT – do inglês *allergen specific immunotherapy*) foi realizado por Noon (1911), injetando extrato de pólen de gramíneas em pacientes alérgicos. Neste estudo foi observada a redução dos sintomas e uma maior tolerância ao alérgeno por quase 1 ano. Anos depois, em 1935, Cooke e sua equipe, após ensaios clínicos bem-sucedidos, demonstraram que a AIT induz a proteção através de anticorpos IgG específicos que podem suprimir a inflamação cutânea induzida pelos alérgenos.

Características importantes da AIT sugerem que esta apresenta muitas vantagens para o tratamento da alergia. Primeiro, por funcionar em um tipo específico de alérgeno e dessa forma levar o sistema imunológico do paciente a estabelecer uma resposta imune contra os alérgenos causadores da doença e segundo, por que as vacinas contra alergia podem ser produzidas com relativa facilidade e baixo custo, quando comparado a tratamentos com agentes biológicos. Além disso, diferente dos tratamentos com perfil anti-inflamatório, a AIT pode parar a progressão tanto da alergia leve (rinite) quanto das formas mais graves de alergia, como a asma, modificando o curso natural da doença (Jacobsen et al., 2007; Valovirta, 2011; Jutel et al., 2015; Valenta et al., 2016).

Os benefícios associados a utilização desse tipo de terapia podem ser vistos por diversos anos mesmo após o término do tratamento, o que não pode ser

alcançado no tratamento sintomático. A imunoterapia alérgeno-específica é capaz de modular tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa, levando a uma tolerância imunológica do organismo, podendo desenvolver-se contra qualquer substância que o organismo é exposto. Os mecanismos pelos quais a AIT irá exercer seus efeitos incluem: a modulação de ambas as repostas de células T e de células B, reduzindo conseqüentemente, a incidência e a gravidade de reações adversas mediadas por IgE (Hamilton et al., 2010; Linhart & Valenta, 2012).

Ao receber uma dose da imunoterapia contendo o alérgeno, ocorre uma mudança do perfil inflamatório T_H2 alergênico para o perfil inflamatório T_H1 e a geração de células imunes regulatórias. Diminuição nos níveis de mastócitos, basófilos e eosinófilos são observados e ocorre um aumento na produção de células T e B regulatórias (Treg/ Breg) específicas para alérgenos (Shamji & Durham, 2017).

A geração de células T regulatórias (Treg) é o evento chave para o desenvolvimento da tolerância imunológica. A tolerância imunológica ocorre de forma periférica e específica, onde a primeira é iniciada pela secreção de IL-10 e TGF- β por células Treg específicas de alérgeno durante a exposição contínua e a segunda está associada ao aumento das células que apresentam marcadores $CD3^+$, $CD25^+$ e $FOXP3^+$ na mucosa nasal (Sackesen et al., 2013) (Figura 6).

A razão pela qual os basófilos e mastócitos sofrem dessensibilização na presença de IgE específica e tornam-se menos suscetível à desgranulação, diminuindo risco de anafilaxia sistêmica, não está clara. Uma explicação é que este mecanismo está relacionado à exaustão dos mediadores das células efetoras durante a administração de doses crescentes de alérgeno nas fases iniciais da AIT. Já a dessensibilização precoce após o desafio com alérgeno, pode ser mediada pela regulação positiva do receptor de histamina 2 (H_2R) que inibe a ativação induzida pelo “*cross-linking*” com $Fc\epsilon RI$ e a posterior liberação dos mediadores inflamatórios (Novak et al., 2012.; Satitsuksanoa et al., 2018).

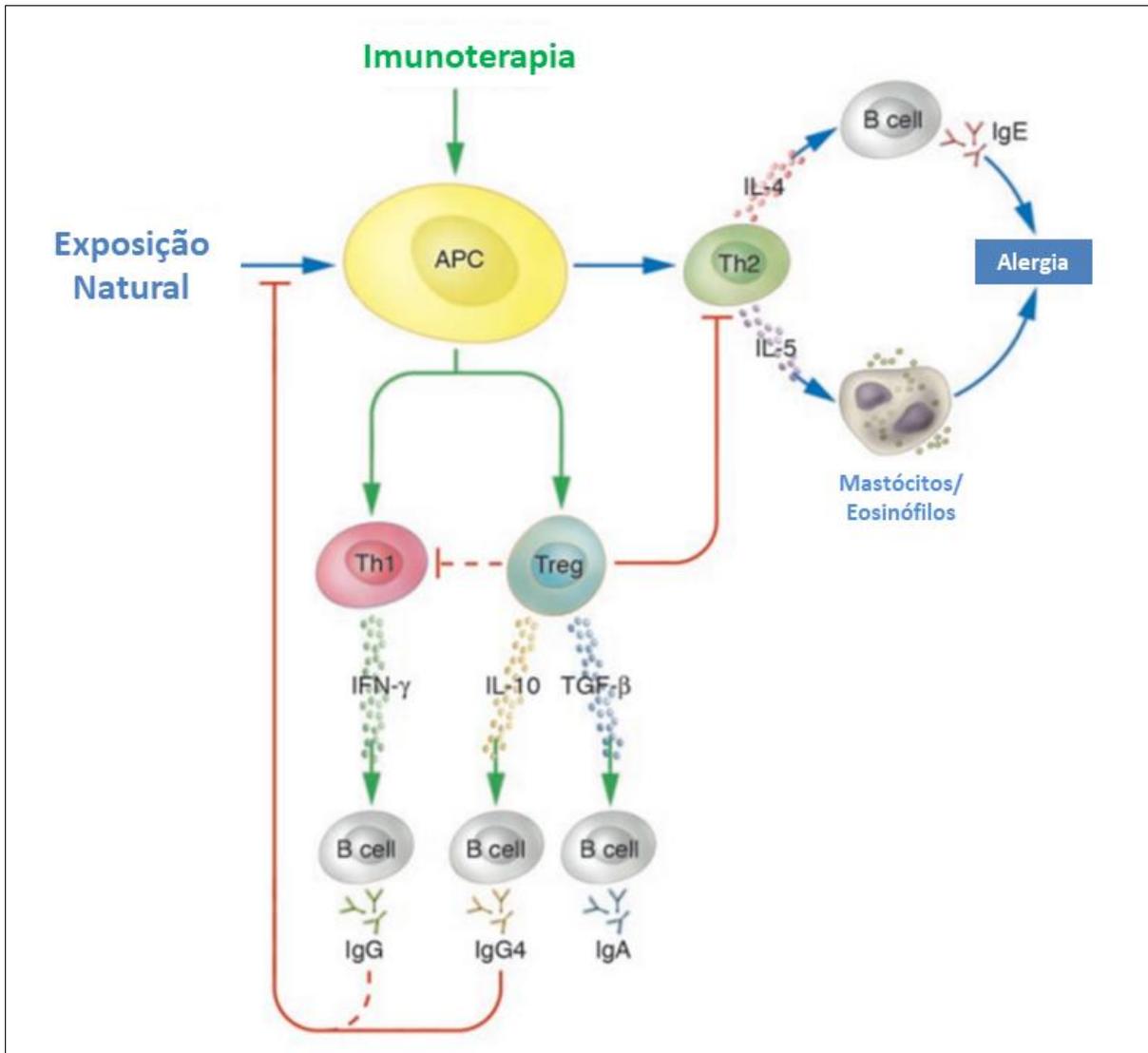


Figura 6: Desenvolvimento de tolerância a alérgenos através de imunoterapia alérgeno-específica. Extraído e Adaptado de Robinson et al. (2004).

Após meses de tratamento com a AIT, é possível observar a diminuição no número de eosinófilos e mastócitos e a liberação limitada de seus mediadores. Uma imunoterapia alérgeno-específica bem-sucedida, tem efeito modificador na doença alérgica, melhorando a qualidade de vida do paciente (Akdis & Akdis, 2014).

Mas também existem alguns impeditivos para a ampla aplicação da AIT. O primeiro deles, é que a AIT está no grupo dos tratamentos da medicina de precisão, onde os alérgenos causadores da doença precisam ser identificados para que a vacina correta seja administrada. O segundo impeditivo está na necessidade de produzir vacinas eficazes e seguras contra diversos alérgenos para serem coadministradas ocorrendo assim a polissensibilização. E em terceiro, é que a

administração da AIT pode causar efeitos colaterais nos pacientes. Dessa forma, programas complexos de tratamento, com administrações múltiplas por exemplo, o tornam inapropriado, levando à baixa adesão dos pacientes. E por fim, a qualidade dos extratos de alérgenos naturais representa um grande obstáculo para a produção de vacinas AIT seguras e eficazes (Valenta et al., 2018; Zhernov et al., 2019).

1.4. Novas abordagens no desenvolvimento de AIT

Apesar do sucesso comprovado da utilização de Imunoterapia alérgeno-específica a partir extratos naturais no tratamento das alergias, AIT ainda é um tratamento comparado a drogas sintomáticas, devido à duração do tratamento (entre 3 a 5 anos de injeções subcutâneas mensais) e o risco de efeitos colaterais anafiláticos (Senti et al., 2005; Burks et al., 2013).

A dose administrada na AIT é importante para garantir o sucesso do tratamento, pois altas doses de alérgenos favorecem a indução de células T regulatórias e modificação do perfil T_H2 . No entanto, quanto maior a dose administrada, maior o risco de induzir efeitos colaterais indesejáveis (Cromwell et al., 2011).

Preocupações com a segurança do paciente e a eficácia do tratamento são as principais razões para a busca de novas abordagens para AIT, dessa forma, novas estratégias para aprimorar a eficácia e a segurança dessas imunoterapias têm sido propostas e incluem o uso de diferentes adjuvantes e estimuladores da resposta imune inata, novas rotas de administração de vacinas e derivados recombinantes hipoalérgenos. Vacinas baseadas em alérgenos modificados são formas altamente eficazes e convenientes de imunoterapias alérgeno-específica, pois apresentam risco reduzido de efeitos colaterais (Jutel & Akdis, 2014; Satitsuksanoa et al., 2018).

As novas propostas para a produção de AIT contam com a utilização de proteínas recombinantes, sintéticas ou DNA, ao invés de utilizar extratos naturais de alérgenos na sua formulação. Após a identificação da sequência genômica de interesse ou o alérgeno em si, estes são amplamente testados através de ensaios *in vitro* e com modelos animais selecionados, a fim de obter informações sobre sua alergenicidade e imunogenicidade (Pfaar et al., 2019).

A era molecular da AIT iniciou-se com peptídeos contendo epítomos de células T curtos, não reativos a IgE, seguidos por peptídeos recombinantes hipoalergênicos, pois as AITs precisavam melhorar imediatamente em dois aspectos: especificidade e segurança (Dorofeeva et al., 2021).

1.4.1. Derivados recombinantes hipoalergênicos

Os derivados recombinantes hipoalergênicos são caracterizados por apresentarem uma reatividade a IgE reduzida. Diversas técnicas de engenharia genética foram desenvolvidas com o objetivo de reduzir a reatividade de IgE, incluindo fragmentação, oligomerização, mutação e remontagem de sequências (Spertini et al., 2016).

Para a obtenção de derivados recombinantes hipoalergênicos, são utilizados diversos procedimentos: a proteína pode ser fragmentada trocando suas sequências de aminoácidos; mutações na estrutura da proteína podem ser realizadas; podem ser criadas proteínas híbridas a partir de fragmentos de outras diferentes proteínas; a orientação espacial da molécula de proteína pode ser alterada; e fragmentos do alérgeno podem ser reagrupados na forma de um mosaico (Rudolf Valenta et al., 2010; Marth et al., 2014; Petrova et al., 2021).

O uso desse tipo de abordagem na AIT faz com que a ligação do antígeno às reaginas diminua, preservando a formação de IgG aos peptídeos inalterados na superfície da proteína. Isso se deve ao sistema imunológico que conta com uma grande variedade de receptores de células B, permitindo o reconhecimento natural de todos os patógenos. No decorrer da imunização, a especificidade e a afinidade dos anticorpos produzidos pelo organismo aumentam. Como resultado, durante a resposta imune, IgGs bloqueadoras, que impedem a ligação do alérgeno à IgE dos pacientes com alergias são obtidas, levando à ausência ou redução das reações mediadas por IgE do tipo imediato ao longo da imunoterapia (Petrova et al., 2021).

Devido à presença de reação cruzada entre as albuminas 2S de mamona com alérgenos de diversas fontes, a preocupação com a sensibilização da população por parte dos alérgenos dessa planta, que é encontrada por todo território brasileiro, tem aumentado. Dessa forma, objetivamos produzir uma proteína

recombinante expressando mutações específicas na isoforma Ric c 3 das albuminas 2S de mamona e confirmar sua hipoalergenicidade, permitindo assim, que o caminho para essa abordagem terapêutica de AIT seja aberto.

2. Objetivo

Produzir uma proteína recombinante hipoalergênica, derivada de um dos principais alérgenos de mamona (*Ricinus communis*), Ric c 3, com potencial biotecnológico para Imunoterapia.

2.1. Objetivos específicos

A) Produção de uma proteína hipoalergênica derivada de Ric c 3

- **Meta A.1** – Expressar e isolar nrRic c 3 e mrRic c 3
- **Meta A.2** – Avaliar a homogeneidade da proteína isolada por eletroforese e por *Western Blotting*

B) Avaliar a resposta imunológica desencadeada por Ric c 3 recombinante natural e mutante

- **Meta C.1** – Analisar a resposta imune específica através de Ensaio de ELISA e por desgranulação de mastócitos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais Biológicos

- Vetor de clonagem pMA contendo o gene sintético de Ric c 3 com as mutações em aminoácidos específicos, adquirido comercialmente (Invitrogen) (Anexo A).
- Cepa ultracompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Nova Blue, genótipo: *endA1 hsdR17* ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F* [*proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10*] (Tet^R), adquirida comercialmente (Stratagene).

- Cepa de *E. coli* - Rosetta-gami₂ (DE3) pLysS, genótipo: D (ara-leu)7697DlacX74 DphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac+lacIq pro]gor522::Tn10 trxBpLysSRARE23 (Cam_R, Str_R, Tet_R4)], adquirida comercialmente (Novagen).
- Camundongos Black-C57 (C57/BL6) e Ratos Wistar, obtidos do Biotério setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR sob aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA/BIO – UFRJ), protocolo nº 1425 (Anexo B).
- O *pool* de proteínas alergênicas de mamona, Albuminas 2S, isolados das sementes (conforme descrito por Campos-Mesquita, 2020) foram cedidos pela mesma.
- DNA genômico codificante da proteína Ric c 3 foi extraído e cedido por Pacheco-Soares (conforme descrito em Pacheco-Soares, 2018).

3.2. Desenho do gene sintético de Ric c 3 mutante

A sequência codificante de Ric c 3 foi desenhada contendo as mutações nos epítopos alergênicos, troca de resíduos de ácido glutâmico (E) por leucina (L), como sugerido por modelagem molecular descrita por Nascimento (2009). Além dessas, foi feita a troca de um resíduo de ácido aspártico (D) por leucina, no peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada. O gene foi sintetizado pela ferramenta GeneArt (Invitrogen) (Figura 7).

Após a síntese da sequência codificante mutante de Ric c 3 (mRic c 3) a empresa fez a ligação desta no vetor pMA verificando se a sequência estava correta, por sequenciamento de nucleotídeo, fornecendo a sequência codificante de mRic c 3 ligada ao vetor pMA (construção mRic c 3-pMA).

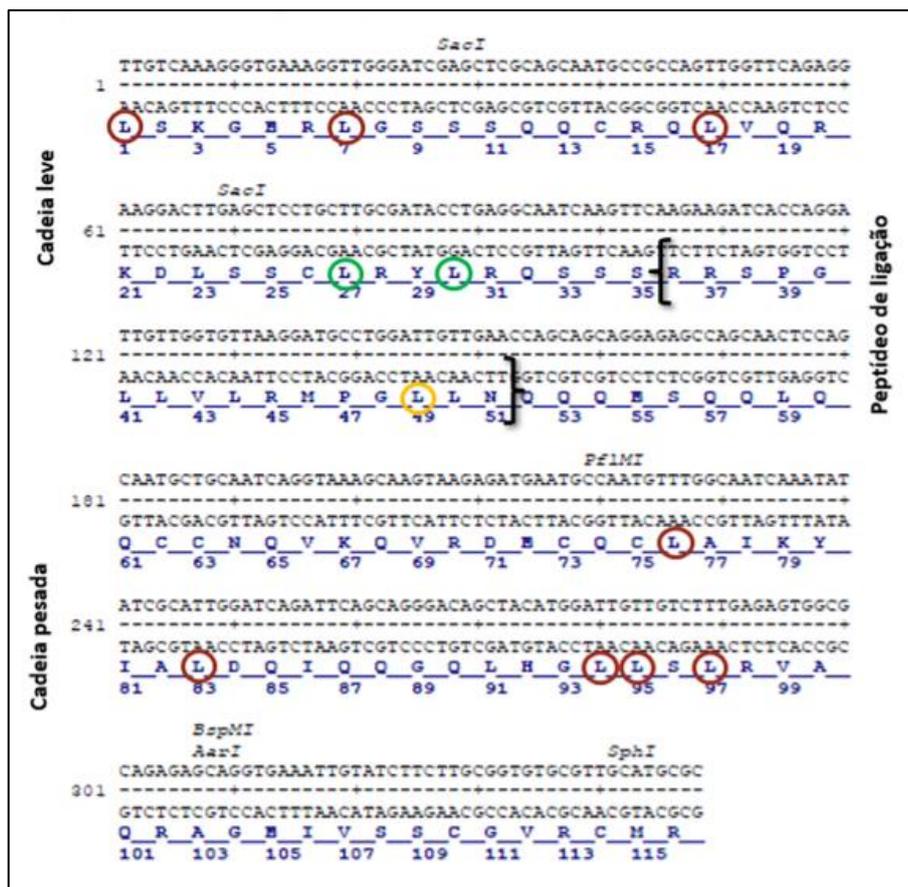


Figura 7: Sequência gênica e proteica de mRic c 3. Os círculos vermelhos sinalizam os resíduos de leucina (L) que substituíram os resíduos de ácido glutâmico (E), como proposto por Nascimento (2009) anteriormente. Os círculos verdes indicam as novas mutações (Glu-Leu) realizadas e o círculo amarelo sinaliza uma troca no resíduo de ácido aspártico (D) por um resíduo de leucina (L) dentro do peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada. Fonte: Invitrogen (com marcações da autora).

3.2.1. Sequência codificante de Ric c 3 nativa

A extração do DNA foi realizada conforme descrito por Pacheco-Soares et al (2018). O DNA genômico foi utilizado para a produção recombinante da proteína nativa (nRic c 3). O mesmo foi clonado em uma cepa de clonagem *E. coli* - JM 109 para manutenção e amplificação da sequência codificante de nRic c 3. Posteriormente, foi realizada a extração plasmidial, mantendo esses plasmídeos conservados em freezer -20 °C. O plasmídeo contendo o DNA genômico da região gênica que codifica a proteína Ric c 3 foi cedido por Pacheco-Soares para utilização neste trabalho (construção nRic c 3-JM 109).

As etapas a seguir (itens 3.3 a 3.6) foram realizadas sob a supervisão e colaboração do Dr. André de Oliveira Carvalho, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) – UENF.

3.3. Produção de células competentes de *E. coli* (linhagem Nova Blue)

Para a manutenção e propagação da construção mRicc3-pMA utilizou-se cepa de *E. coli* competente da linhagem Nova Blue, preparadas na seguinte forma: Cultura fresca contendo colônias de *E. coli*, linhagem Nova Blue, foi inoculada em tubo Falcon contendo 20 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido e incubado por 16h a uma temperatura de 37 °C sob agitação a 250 rotações por minuto (rpm).

Após o período de incubação, alíquotas de 150 µL foram adicionadas a 100 mL de novo meio LB líquido contido em frasco Erlenmeyer, ficando incubado por 3h, a 37 °C e agitação de 175 rpm, para que a cultura alcançasse a densidade óptica (D.O.₆₀₀) entre 0,5 – 1,0 necessária para o preparo das células competentes.

Ao alcançar a D.O.₆₀₀ desejada, o frasco foi incubado em um banho de gelo por 10 minutos e após, o conteúdo foi transferido para tubos Falcon e centrifugados por 10 minutos a 620 g a 4 °C. No final do processo, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo células foi ressuscitado em 5 mL de solução TB (PIPES 10 mM pH 6,7; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM; KOH; MnCl₂ 55 mM) sendo novamente centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi mais uma vez descartado e o sedimento de células foi novamente suspenso em 5 mL de solução TB.

Foram adicionados 62,5 µL de DMSO 100% (dimetilsulfóxido) às células e estas foram homogeneizadas delicadamente e incubadas por 10 minutos no gelo. Após esse período, mais 62,5 µL de DMSO 100% foram adicionados e a suspensão de células foi novamente homogeneizada.

Ao final do processo, alíquotas de 200 µL foram transferidas para tubos de microcentrífuga autoclavados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a - 70 °C.

3.4. Transformação da cepa de clonagem Nova Blue com vetor pMA contendo mRicc3

Para a transformação da cepa *E. coli* Nova Blue competente, foi utilizada a construção mRicc3-pMA.

4 µg do vetor (construção mRi c 3-pMA) foi incubado em 200 µL de células competentes onde permaneceram por 10 minutos no gelo. Em seguida, o material foi transferido para banho-maria a 42 °C por 90 segundos e novamente transferido para o gelo permanecendo incubado por mais 10 minutos. Essa etapa de incubação com choque-térmico é necessária para que a membrana plasmática da bactéria se desestabilize e o vetor seja capaz de ser inserido na célula.

Posteriormente, foram adicionados 800 µL de meio LB líquido às células, ficando essas incubadas sob agitação de 200 rpm por 1 hora a 37 °C. Terminado o período de incubação, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado de células foi ressuscitado e plaqueado com auxílio de alça de Drigalsky em placa de Petri com meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina.

As placas foram mantidas incubadas a 37 °C por 16 horas e posteriormente foi feita a identificação da presença de colônias transformadas. As colônias foram selecionadas e inoculadas em 20 mL de meio LB líquido com ampicilina por 16h a 37 °C.

3.5. Extração e digestão plasmidial de *E. coli* – Nova Blue transformadas com mRi c 3

Para a extração plasmidial, 750 µL de cultura celular foi transferida para tubos e centrifugada por 30 segundos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas pela adição de 300 µL de solução TENS (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 100 mM de NaOH, 25 mM de SDS) sob agitação vigorosa por 10 segundos. Após, foi adicionado 150 µL de acetado de sódio (1,5 M), seguido de centrifugação por 3 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde 1 mL de etanol (100%) gelado foi adicionado e foi feita a centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm. Foi feito o descarte do sobrenadante e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol (70%) gelado e novamente uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, e após, ressuscitado em 40 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA) contendo RNase a 40 ng/µL e incubado a 37°C por 1 hora.

3.6. Amplificação gênica e clonagem em vetor de expressão pET-32 EK-LIC

Para a clonagem no vetor de expressão pET-32 EK-LIC (Novagem), primeiramente foram desenhados manualmente iniciadores com a sequência de nucleotídeos específica e necessária para a ligação de nRic c 3 e mRic c 3 ao vetor. As propriedades físicas, bem como temperatura de anelamento e porcentagem de C/G (conteúdo de citosina-guanina) foram analisadas utilizando a ferramenta do sítio NCBI (*primer blast*) (Figura 8).

<p>nRic c 3</p> <p>Sense</p> <p>5' GACGACGACAAGATGGAGTCAAAGGGTGAAAGGGAAG 3'</p> <p>Tm: 62,5° C, CG: 51,35%</p> <p>Anti- sense</p> <p>3' CACACGCAACGTACGCGTCATTGGCCCGAAGAGGAG 5'</p> <p>Tm: 70,19° C, CG: 65, 62%</p> <p>mRic c 3</p> <p>Sense</p> <p>5' GACGACGACAAGATGTTGTCAAAGGGTGAAAGGTTGG 3'</p> <p>Tm: 64,1° C, CG: 48,65%</p> <p>Anti- sense</p> <p>3' CACACGCAACGTACGCGTCATTGGCCCGAAGAGGAG 5'</p> <p>Tm: 70,19° C, CG: 65, 62%</p>

Figura 8: Sequência dos iniciadores usados para a ligação ao vetor pET-32 EK/LIC. Destacado em azul está a sequência que anela ao vetor e em preto indica a sequência que anela com a região codificante de nRic c 3 e mRic c 3. Abaixo de cada iniciador é mostrada a Temperatura (Tm) e a porcentagem de CG. Fonte: própria autoria.

A escolha por este vetor foi devido suas características particulares e importantes para o processo de produção da proteína de interesse. Essas características são: a presença do gene lac 1, que codifica a proteína repressora lac; um promotor T7 específico para a enzima T7 RNA polimerase; um operador lac, responsável pelo bloqueio da transcrição; um sítio de policlonagem; uma origem de replicação e um gene de resistência a um antibiótico. Somada as estas características, o vetor pET também possui uma sequência de histidinas consecutivas (cauda poli-His) que é adicionada a proteína expressa facilitando o seu reconhecimento. Além disso, as proteínas recombinantes expressas neste vetor são

ainda fusionadas à tioredoxina, que ajuda na solubilidade da proteína recombinante e ajuda a evitar a formação de corpos de inclusão.

O vetor também conta com um sistema independente de ligação (LIC - do inglês *ligation independent cloning*) que facilita o processo de clonagem, pois não é necessária a digestão com enzima de restrição ou de reação de ligação (Figura 9).

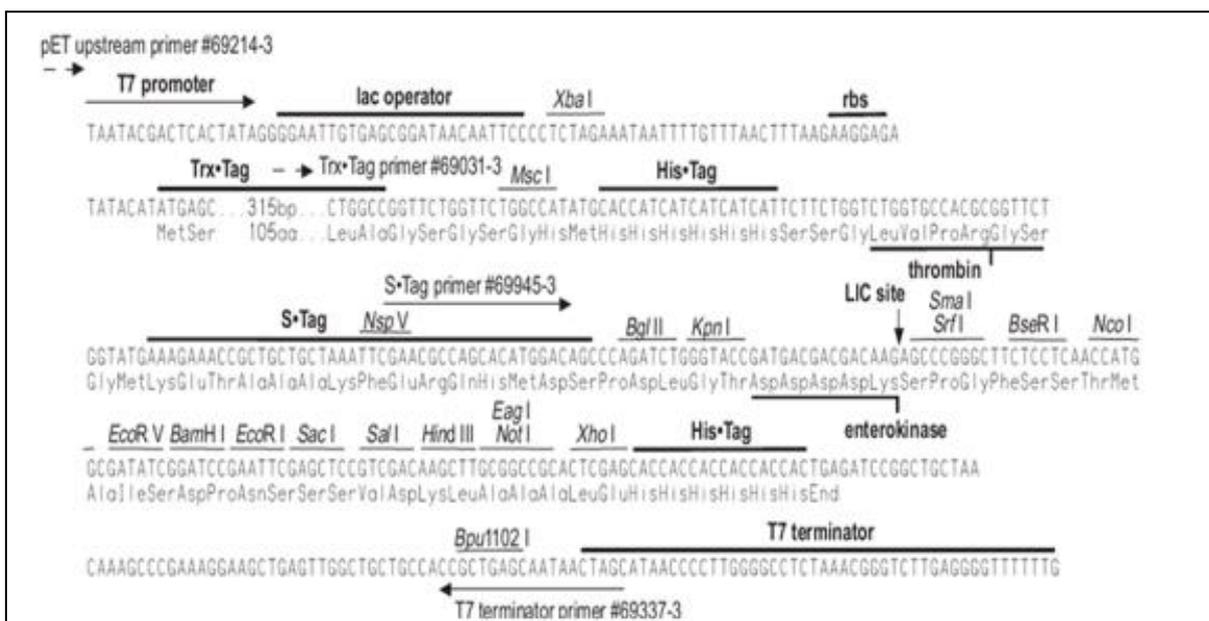


Figura 9: Detalhamento da região do sítio de policlonagem do vetor pET-32 EK/LIC onde a sequência codificante do gene de interesse é inserida no sítio LIC. Fonte: Novagem pET system manual.

A reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês *polymerase chain reaction*) para a amplificação gênica foi realizada com as seguintes quantidades: 4 µl de Tampão 5x, 0,4 µl dNTP, 2 µl de primer sense e 2 µl de primer anti-sense, 0,4 µl MgCl₂, 0,6 µl de DMSO, 0,2 µl da Taq Phusion, 9,4 µl de H₂O e 1 µl de DNA. As quantidades apresentadas referem-se a uma (1) reação em cadeia da polimerase, resultando num volume total de 20 µL.

Condição:

98 °C	30 s	}	1x
98 °C	10 s		
Gradiente de Temperatura:			
75 °C	30 s	}	35x
70 °C			
65 °C			
72 °C	10 m	}	1x
4 °C	∞		

A verificação do resultado da PCR foi realizada por meio de gel de agarose 1% corado com GelRed™ (proporção 1:4).

Após a PCR, foi feito o tratamento do produto amplificado com a T₄ DNA polimerase. O tratamento foi feito da seguinte forma: 2 µL do produto amplificado, tampão T₄ DNA polimerase 1x, ATP 25 mM, DTT 1 mM, T₄ DNA polimerase 0,1 u/µL, completando o volume para 10 µL com água ultrapura. A reação foi incubada por 15 minutos a uma temperatura de 22 °C e inativada a 72 °C por 20 minutos. Dessa forma, o fragmento se encontra pronto para o anelamento ao vetor pET-32 EK-LIC.

A reação de anelamento ao vetor pET-32 EK-LIC, ocorreu na seguinte sequência experimental: 0,5 µL do vetor pET-32 EK-LIC e 2 µL do produto de reação do fragmento tratado com a T₄ DNA polimerase equivalente a 100 ng/ µL, foram incubados por 5 minutos a 22 °C. Em seguida foi adicionado 1 µL de EDTA e 0,5 µL de água ultrapura e uma nova incubação nas mesmas condições anteriores. Após estas etapas obtivemos a construções nRic c 3-pET e mRic c 3-pET.

3.7. Transformação bacteriana em cepa de superexpressão – *E. coli* linhagem Rosetta-gami

As próximas etapas (itens 3.7 a 3.13) foram realizadas sob a supervisão e colaboração do Dr. Breno Castello Branco Beirão, no Laboratório de Imunologia Comparada (LIC) do Setor de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

A célula hospedeira utilizada para a superexpressão das sequências natural e mutante de Ric c 3, foi a *E. coli* linhagem Rosetta-gami₂ (DE₃) pLysS, pois esta possui características necessárias para a ativação da transcrição pela T7 RNA polimerase.

Para isso, 1 µL do vetor (construções nRic c 3-pET e mRic c 3-pET) foi incubado em 100 µL de células sendo transferidos para cubeta gelada. Com as amostras na cubeta, o material foi levado para o eletroporador (Bio-render gene pulser X cell).

A amostra foi retirada da cubeta e colocada em tubo Falcon contendo 1 mL de meio LB líquido. Este foi incubado por 1 hora a 37 °C sob agitação de 200 rpm

Terminado o período de incubação, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado de células foi ressuspenso e plaqueado com auxílio de alça de Drigalsky em placa de Petri com meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol.

As placas foram mantidas incubadas a 37 °C por 16 horas e posteriormente foi feita a identificação da presença de colônias transformadas.

3.8. Indução da superexpressão de Ric c 3 nativa e mutante recombinante (nr Ric c 3 e mrRic c 3)

Primeiramente, foram inoculadas colônias isoladas de *E. coli* linhagem Rosetta-gami₂ (DE₃) pLysS transformadas com as construções nRic c 3-pET e mRic c 3-pET em 10 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). As cepas foram mantidas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Esses inóculos foram então transferidos para Erlenmeyer contendo meio LB líquido e os antibióticos ampicilina e cloranfenicol (1% do volume da indução) e deixados sob agitação por aproximadamente 3 horas e meia até atingir a D.O.₆₀₀ de 0,3 – 0,6. Após o crescimento, foi adicionado 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosida) para ativar o processo de indução da tradução de Ric c 3 nativa recombinante (nrRic c 3) e Ric c 3 mutante recombinante (mrRic c 3). As culturas que não tiveram adição de IPTG foram avaliadas como controle “não induzido”. Todas as culturas foram agitadas a 200 rpm e mantidas a 37 °C por 16 horas.

3.9. Avaliação da expressão das proteínas recombinantes

A fim de confirmar a expressão das proteínas recombinantes nrRic c 3 e mrRic c 3 pela *E. coli*, foram realizadas Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 15% e *Western Blotting* com anticorpo monoclonal anti- 6x-His Tag.

Primeiramente foi realizada a eletroforese (SDS-PAGE 15%) conforme descrito por Laemmli (1970). Foi aplicado ao gel uma alíquota (20 µL do precipitado da indução) das amostras que foram submetidas a indução por IPTG e sem adição de IPTG. A corrida foi realizada a 120 V e 400 mA.

Após esta etapa, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose para realização da técnica de *Western Blotting* (TOWBIN et al., 1979). A transferência foi realizada em sistema semi-seco em um “sanduíche” de papel filtro embebido em tampão de transferência (20 mM de Tris, 145 mM de glicina e metanol 20%) sob uma corrente de 400 mA/ 100 V constantes, por 1 hora.

Após a transferência, a membrana foi embebida em tampão bloqueador (PBS Tween 0,05% e 3% de leite em pó desnatado) por um período de 1 hora. Posteriormente, foi diluído no tampão bloqueador o anticorpo primário anti His-Tag e incubado por 18 horas a 4° C. Em seguida a membrana foi lavada 3 vezes em PBS Tween 0,05% (PBST), com duração de 5 minutos por lavagem. Após, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com HPR (*Horseradish Peroxidase*) diluído em tampão bloqueador. Após o período de incubação foi realizada novamente 3 lavagens de 5 minutos cada em PBST. A revelação foi feita utilizando o Kit - ECL™ *Western Blotting Detection Reagent*, que faz a detecção por quimiluminescência.

3.10. Obtenção das proteínas expressas

3.10.1. Lise celular

Após as etapas de indução e confirmação através de *W. Blotting*, seguimos para a etapa de lise celular. Extratos bacterianos induzidos foram selecionados e transferidos para tubos de centrífuga. Estes foram centrifugados por 30 minutos a

5.000 g. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado Tampão de Uréia 8 M, ficando no orbital por no mínimo 15 minutos até o que todo o material fosse ressuspendido.

O material seguiu então para etapas na French[®] Press, que através de alta pressão, rompe a parede celular das bactérias. E após a lise celular, foi realizada uma nova centrifugação por 10 minutos a 5000 g. O sobrenadante foi utilizado na etapa seguinte.

3.10.2. Cromatografia de afinidade (níquel-agarose)

Ao final da etapa de lise celular na French[®] Press, seguimos para a purificação das proteínas recombinantes através da cromatografia de afinidade a níquel. A escolha do método de purificação da proteína expressa com vetor pET-32 EK-LIC foi pela expressão das proteínas recombinantes estarem fusionadas a 6 histidinas.

A coluna foi carregada com 400 µL de resina agarose contendo níquel (Ni²⁺) e equilibrada com 4 mL de Tampão de Ligação pH 8,5 (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, Uréia 8M). Posteriormente, foi adicionado 1 mL do extrato bacteriano e esse foi misturado a resina. Essa resina foi colocada no tubo Falcon com o restante do extrato e levada para agitação no orbital por cerca de 30 minutos.

Terminado esse período, a resina junto com o extrato bacteriano foi recolocada na coluna e então foram realizadas duas lavagens de 4 mL (total de 8 mL) com Tampão de Lavagem pH 6,3 (citrato de sódio dihidratado, ácido cítrico, Uréia 8 M, NaCl 100 mM).

A eluição das proteínas foi feita com 400 µL de Tampão de Eluição pH 4,5 (citrato de sódio dihidratado, ácido cítrico, Uréia 8 M, NaCl 100 mM). Foram coletadas 8 frações de 400 µL cada.

3.10.3. Diálise

Após a obtenção das amostras purificadas na cromatografia de afinidade – níquel agarose, o material passou por uma etapa de diálise para a separação segundo o gradiente de concentrações. Foram utilizadas as amostras purificadas

que apresentaram valor maior que 0,1 mg/ml após leitura em espectrofotômetro NanoDrop™2000.

A membrana da diálise foi cortada e hidratada com água destilada. As proteínas recombinantes obtidas foram então dialisadas extensivamente contra Tampão Fosfato Salino – PBS 1x, durante 24 horas a 4 °C com 3 trocas de tampão.

Ao término desse período, os materiais foram recolhidos, dosados novamente e armazenado em freezer -20 °C para utilização nas etapas seguintes.

3.11. Ensaios Biológicos

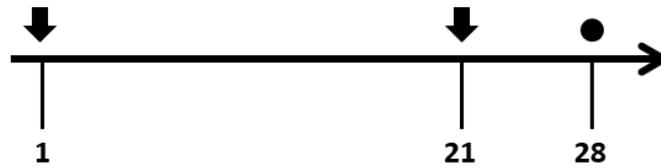
Ensaios biológicos foram realizados para verificar a presença de atividade nas proteínas recombinantes expressas assim como confirmar a hipoalergenicidade de mrRic c 3.

3.11.1. Imunização dos animais

Inicialmente, camundongos Black-C57 (C57/BL6) (n = 6/ grupo) foram tratados duas vezes com 100 µL das proteínas nrRic c 3 e mrRic c 3 na concentração final de 1mg/ml conjugada a 100 µL de adjuvante completo de Freund por via subcutânea com intervalo de 21 dias para cada imunização (Esquema 1).

3.11.2. Obtenção do soro

Sete dias após a segunda imunização, o sangue dos animais tratados foi coletado via punção do plexo retro-orbital. Para isso, os animais foram anestesiados com 0,5 mL de mix de anestésico (Cetamina + Xilasina) e a coleta foi feita com auxílio de um tubo capilar. Após a coleta, o sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 7.000 rpm para a obtenção do soro. Estes soros foram utilizados nas etapas seguintes.



Esquema 1: Protocolo de imunização. As setas representam os dias de imunização e o ponto representa o dia da coleta de sangue. Fonte: própria autoria.

3.12. Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA)

Foi realizado um ensaio de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para análise dos níveis de IgE, IgG e IgG1 específicos no soro dos animais tratados. Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com 500 ng das proteínas recombinantes, nrRic c 3 e mrRic c 3, em 50µL de Tampão carbonato pH 9,6 e incubada por 1 hora a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 200 µL de solução de bloqueio, composta por PBS contendo Soro Fetal Bovino (SFB), ficando incubada por 1 hora. Após o período de incubação, foi realizada uma lavagem com PBS.

Posteriormente, foi adicionado aos poços 50 µL dos soros dos camundongos imunizados (anticorpo primário) diluídos nas proporções de 1: 10 em PBS contendo 10% de SFB e 5% de extrato bacteriano, ficando incubados durante 1 hora a 4 °C, seguidas de 6 passos de lavagem com PBS.

Seguindo, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário nas proporções: IgE - 1: 2000; IgG - 1: 5000; IgG1 - 1: 5000, durante 1 hora a 4 °C, seguidas de mais 6 passos de lavagem com PBS.

A detecção foi realizada utilizando TMB (Tetrametilbenzidina) e 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M adicionado após a reação ficar azul. A densidade ótica foi analisada em leitor de microplacas 450 nm.

3.13. Ensaio de Desgranulação de mastócitos

O ensaio de desgranulação de mastócitos foi realizado como proposto por (Deus-de-Oliveira et al., 2011b). Inicialmente, para obtenção de mastócitos, 3 Ratos

Wistar com aproximadamente 250 gramas foram sacrificados por asfixia em CO₂ (Dióxido de Carbono) e a cavidade peritoneal lavada com 20 mL de Meio DMEM (*Dulbecco Modification of Minimum Essential Media*) gelado contendo 12 u/ mL de Heparina.

Cerca de 15 mL do lavado retirado do peritônio do animal, foi colocado em placa de Petri e incubado por 30 minutos a 37 °C para separar os mastócitos dos macrófagos. Após este período, 2/3 do sobrenadante foi retirado cuidadosamente e descartado. O volume restante, do meio enriquecido com mastócitos, foi dividido em alíquotas de 100 µL (aproximadamente 1.0×10^4 células).

Essas alíquotas de meio enriquecido com mastócitos foram incubadas com 2 µL de soro total anti-albumina 2S de mamona e 10 µL de nrRic c 3 ou mrRic c 3 na concentração final de 10 µg/ mL, durante 1 h a 37 °C. Para o controle positivo, as células foram incubadas com 2 µL de soro total anti-albumina 2S de mamona e 10 µL do pool de Albuminas 2S (Ric c 1 e Ric c 3) e para o controle negativo, a incubação do meio foi apenas contendo 2 µL de soro.

Após o período de incubação, foi feita a contagem diferencial dos mastócitos por microscopia ótica. À suspensão de células incubadas (controle positivo, negativo e teste) foram adicionados 10 µL de solução aquosa contendo azul de toluidina 0,1%, formaldeído 10% e ácido acético 1%, pH 2,8, para evidenciar a observação dos grânulos celulares.

A contagem diferencial entre células íntegras e desgranuladas foi realizada utilizando câmara de Neubauer, com contagem nos quatro quadrantes, através da observação em microscópio óptico Zeiss Axioplan.

4. Resultados

4.1. Indução da expressão de nrRic c 3 e mrRic c 3

As construções nRic c 3-pET e mRic c 3-pET foram utilizadas para transformação da cepa *E. coli* linhagem Rosetta-gami₂ (DE₃) pLysS. Após o processo de transformação bacteriana, foi então realizada a indução da expressão das proteínas adicionando 1 mM de IPTG.

Através da análise eletroforética em Gel de Poliacrilamida 15%, foi possível observar que as células de *E. coli* - Rosetta-gami submetidas a indução expressaram um perfil proteico com banda de aproximadamente 29 kDa, não visualizada nas células que não foram induzidas (Figura 10).

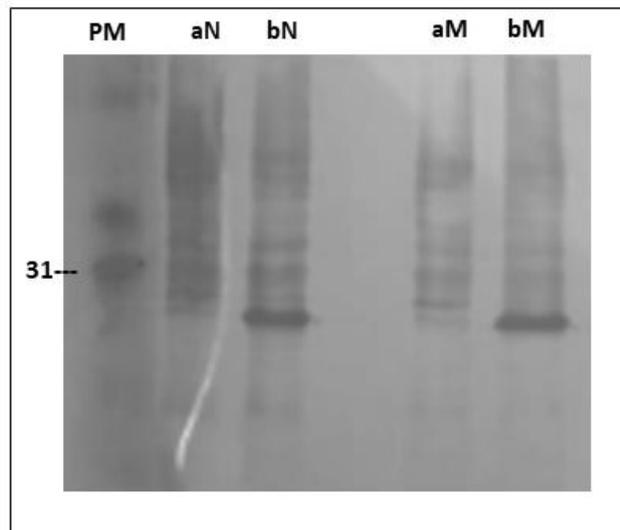


Figura 10: Visualização eletroforética da indução da expressão de nrRic c 3 e mrRic c 3 com 1mM de IPTG por SDS-PAGE. PM: Padrão de massa molecular; aN e aM: representam os extratos controle “Não Induzido” de nrRic c 3 e mrRic c 3 respectivamente; bN e bM: representam os extratos Induzidos de nrRic c 3 e mrRic c 3 respectivamente. Fonte: Dados da pesquisa.

As proteínas expressas passaram então pelas etapas de lise celular e purificação por cromatografia de afinidade a níquel e a confirmação se deu pelo ensaio de *Western Blotting* utilizando anticorpo primário anti-6x-His Tag (Figura 11).

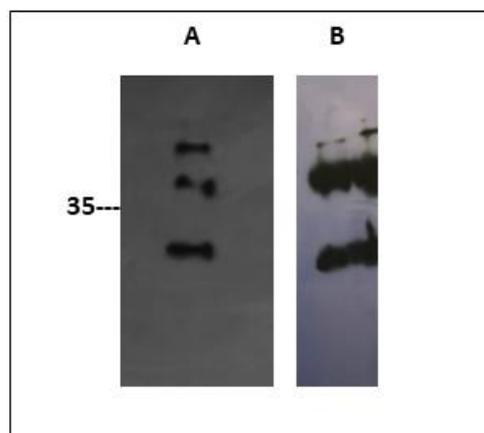


Figura 11: Análise da indução da expressão por *Western Blotting* após etapa de purificação em coluna Ni-NTA utilizando anticorpo primário anti-His (1: 4000). A: expressão de mrRic c 3; B: expressão de nrRic c 3. Fonte: Dados da pesquisa.

4.2. Avaliação do perfil de anticorpos produzidos no processo de Imunização em camundongos Black-C57

Um ELISA foi realizado a partir do soro obtido de cada animal imunizado (6 animais por grupo) seguindo o protocolo de 21 dias entre as imunizações. Através da avaliação do perfil de produção de anticorpos IgE, IgG total e IgG1, foi observado que na razão IgE/IgG total do grupo tratado com a proteína recombinante natural (nrRic c 3), a produção de IgE foi maior do que no grupo tratado com a proteína mutante (mrRic c 3). Além disso, quando observamos a razão IgG1/IgG total, o grupo tratado com nrRic c 3 também apresentou níveis altos de IgG1 em relação a IgG total, diferente do grupo tratado com a mutante, que teve valores menores (Figura 12). Tanto IgE quanto IgG1 são anticorpos produzidos em reações de hipersensibilidade do tipo I (reações alérgicas), dessa forma consideramos que a proteína recombinante natural (nrRic c 3) manteve sua capacidade de ligação a IgE específica e que as mutações realizadas na região codificante de Ric c 3, diminuiram a capacidade de ligação da proteína recombinante mutante (mrRic c 3), assim como objetivamos.

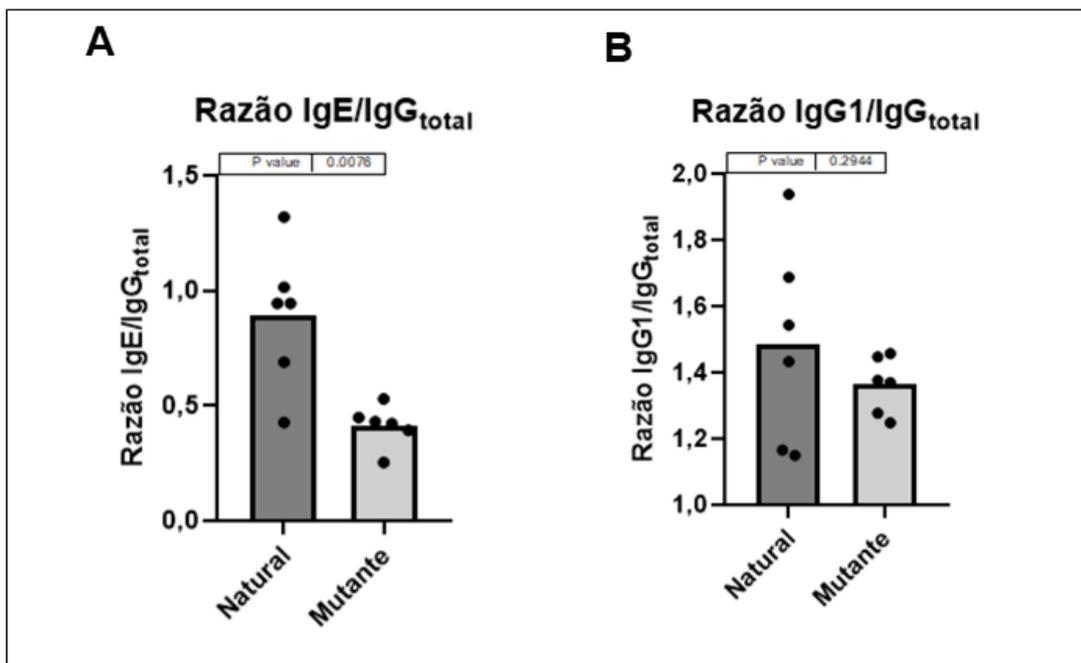


Figura 12: Perfil de anticorpos produzidos após imunização com nrRic c 3 e mrRic c 3. A: Razão IgE/ IgG total e B: Razão IgG1/ IgG dos grupos tratados com as proteínas natural e mutante respectivamente. O ensaio foi realizado em duplicata. Fonte: Dados da pesquisa – GraphPad Prism 8.

4.3. Análise da atividade alergênica

A análise da atividade alergênica das proteínas recombinantes foi observada através do ensaio de desgranulação de mastócitos realizado em triplicata. Inicialmente foi observada a diminuição na capacidade de desgranulação de mastócitos, como proposto pelas mutações realizadas na sequência gênica. Por meio deste ensaio, pode-se observar que mrRic c 3 (recombinante mutante) induziu 20% de desgranulação, valor bem próximo ao controle negativo, 12%. Já a proteína recombinante sem mutações (nrRic c 3) induziu 62% de desgranulação dos mastócitos e o extrato contendo Ric c 1 e Ric c 3 (pool de albuminas 2S de mamona) – controle positivo, induziu 70%. (Figura 13).

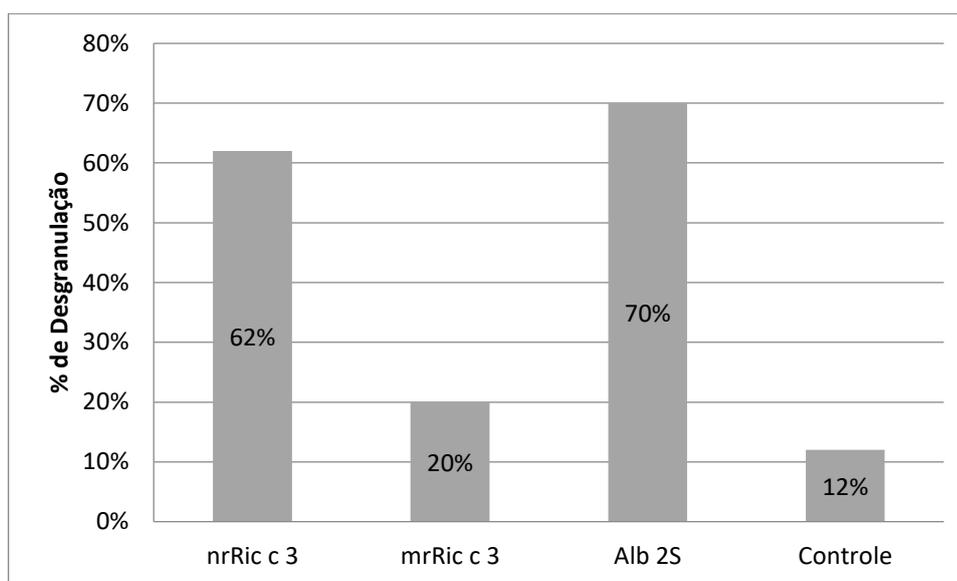


Figura 13: Ensaio de desgranulação de mastócitos. nrRic c 3 (mastócitos + soro anti-albumina 2S + Ric c 3 recombinante); mrRic c 3 (mastócitos + soro anti-albumina 2S + Ric c 3 mutante recombinante). Albuminas 2S/ controle positivo (mastócitos + soro anti-albumina 2S + Pool de Albuminas 2S - Ric c 1 e Ric c 3); Controle negativo (mastócitos incubados apenas com soro anti-albumina 2S). O ensaio foi realizado em triplicata. Fonte: Dados da pesquisa.

5. Discussão

Sabe-se que a prevalência das alergias mediadas por IgE tem crescido ao redor do mundo e no Brasil, há cerca de 16 milhões de pessoas alérgicas (ASBAI, 2022). A preocupação em relação ao nosso país aumenta quando observamos o crescimento do cultivo da mamona (*Ricinus communis*), pois esta apresenta um grande potencial tóxico e alergênico dado pelas proteínas presentes em suas sementes e pólen. A situação se agrava pela presença de respostas cruzadas entre alérgenos da mamona com alérgenos de fontes alimentares e aeroalérgenos.

Su et al. (2016) projetaram uma imunoterapia a partir do alérgeno Cry j 2 do pólen do cedro vermelho japonês. Os resultados indicaram que a vacina é segura e tem potencial terapêutico para indivíduos sensíveis ao pólen do cedro japonês e ao Mountain cedar (MC). MC reage de forma cruzada com o alérgeno do pólen do cedro japonês. Os pesquisadores então verificaram que as proteínas Jun a 1 e Jun a 2 de MC compartilham 80% e 71% de identidade com Cry j 1 e Cy j 2 respectivamente, sendo essa uma terapia eficaz para os dois grupos.

Estudos visando conhecer melhor os mecanismos alérgicos e buscando estratégias para profilaxia de doenças alérgicas tem sido de grande importância, pois, reduziriam os casos de alergia e conseqüentemente os gastos da saúde pública com medicamentos que tratam apenas os sintomas (van Zelm et al., 2021).

Tratamentos convencionais contra doenças alérgicas se baseiam em uso de anti-histamínicos, que aliviam os sintomas da alergia, mas não curam nem previnem a doença. A produção de mutantes hipoalergênicos é uma das abordagens promissoras na proteção contra o desenvolvimento de respostas alérgicas (Jongejan et al., 2016). É com base nessa problemática que o presente estudo foi desenvolvido.

O objetivo principal dessa pesquisa foi o desenvolvimento de um hipoalérgeno, uma proteína recombinante desenvolvida a partir de *Ricinus communis*, contendo mutações em resíduos de aminoácidos específicos e estratégicos, para utilização como uma imunoterapia alérgeno-específica.

Essa pesquisa teve início baseada no estudo “*in silico*” de modelagem molecular por homologia de Nascimento (2009). A proposta era que mutações teóricas trocando aminoácidos específicos e importantes no desencadeamento da alergia, reduziriam o potencial alergênico da proteína. Analisamos a sequência

gênica que codifica a isoforma Ric c 3 e desenhamos o gene sintético, contendo outras trocas de aminoácidos, além das propostas, que julgamos importantes nessa interação com a IgE.

Foram substituídos ao todo, nos 4 epítomos ligantes de IgE, dez resíduos específicos de ácidos glutâmicos (E) por resíduos de leucina (L) e 1 resíduo de ácido aspártico (D) por resíduo de leucina dentro do peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada da isoforma (Figura 7).

Um estudo *in silico* realizado com o aeroalergeno Zea M 1, alérgeno do pólen de milho, apresentou potencial significativo para a produção de uma vacina. Os pesquisadores avaliaram os epítomos importantes para compor uma vacina baseada na combinação de epítomos de células B e T e concluíram que o epítomo de célula T apresentou um ajuste ideal e estável ao sulco de ligação do complexo MHC I, sendo um forte promissor para a criação de uma imunoterapia (Basu et al., 2018).

Outro estudo *in silico* mais recente projetou variantes mutantes do alérgeno do ácaro da poeira doméstica, Der p 21 (*Dermatophagoides pteronyssinus*). Simulações de dinâmica molecular demonstraram os efeitos globais dessas mutações na estabilidade estrutural do alérgeno (Santos et al., 2022).

A região codificante foi então sintetizada comercialmente e toda etapa de clonagem, transformação, indução e purificação seguiu como descrito nos itens 3.3 a 3.10.3.

É importante destacar que em sua forma natural, na planta, as isoformas alergênicas das albuminas 2S são formadas por duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes de enxofre. Estas isoformas são produzidas a partir de um único precursor que sofre processamento pós-traducional por endopeptidases e carboxipeptidases, liberando as duas isoformas, Ric c 1 e Ric c 3, ambas constituídas de duas cadeias polipeptídicas (Irwin et al., 1990). No entanto, este processamento poderia não ocorrer em sistema bacteriano de produção de proteínas recombinantes. Nossa abordagem de produzir Ric c 3 mutante recombinante como uma única cadeia polipeptídica foi também adotada por Pantoja-Uceda et al. (2003) que produziu Ric c 3 recombinante para estudos estruturais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Pantoja-Uceda et al. (2003) elucidou a estrutura tridimensional de Ric c 3, mas não avaliou suas propriedades biológicas.

Já a produção da proteína recombinante sem mutações (nrRic c 3) se deu a partir da extração do DNA da folha de *R. communis* seguido por um PCR a fim de amplificar a região genômica correspondente a Ric c 3. Este gene foi clonado em um vetor de clonagem e utilizado para transformar uma cepa de *E. coli* para a sua replicação e manutenção em um sistema biológico. O plasmídeo produzido por Pacheco-Soares et al. (2018) foi extraído e armazenado em freezer -70°C e cedido a esta pesquisa para sua utilização.

Após a obtenção dos plasmídeos contendo as regiões codificantes das proteínas natural e mutante, realizou-se a clonagem em vetor de expressão pET-32 Ek/LIC. Este vetor foi escolhido por inserir as proteínas recombinantes a tioredoxina (Trx), que auxilia na solubilidade e contribuiu para a formação de pontes dissulfeto nas proteínas. É conhecido que a produção de proteínas recombinantes em bactérias às vezes se torna difícil devido a sua insolubilidade e pela não formação de pontes dissulfeto na proteína recém-sintetizada. Geralmente, problemas como esses fazem com que a proteína recombinante produzida não apresente a mesma atividade biológica da proteína naturalmente expressa (GRÄSLUND et al., 2008).

Para a síntese de Ric c 3 natural e mutante, estas alterações, fornecidas pelo uso do vetor de expressão pET-32 Ek/LIC, se mostraram eficientes na produção da proteína recombinante, como pode ser observado pela técnica de *Western Blotting* utilizando anticorpo primário monoclonal anti-6x-His Tag e nos ensaios realizados.

Trabalhos recentes corroboram com a nossa proposta de produção de hipoalérgenos a partir de mutações em aminoácidos pontuais. Como nesse estudo de Raith et al., (2019) em que foi produzida uma variante hipoalergênica do pólen de gramínea (Phl p 7), importante alérgeno respiratório, cuja capacidade de ligação à IgE depende da presença de cálcio. Os pesquisadores realizaram mutações pontuais específicas nas regiões de ligação ao cálcio do alérgeno e os resultados de ensaios de Dot Blot realizados com soros de pacientes sensibilizados com Phl p 7 mostraram uma reatividade de IgE drasticamente reduzida do mutante em comparação a proteína selvagem, e os ensaios de ativação de basófilos indicaram uma atividade alérgica significativamente reduzida.

No trabalho de Santos et al. (2022) foram selecionadas quatro substituições principais (D82P, K110G, E77G e E87S) para construir variantes mutantes do alérgeno Der p 21. Estas variantes foram então expressas de forma recombinante

em bactérias e testadas para suas reatividades de IgE, onde duas dessas variantes mostraram reatividade reduzida com IgE.

Iniciamos nossas análises de atividade biológica das proteínas recombinantes idealizando um protocolo de imunização em camundongo Black-C57 (C57/BL6) com a finalidade de observar o perfil de anticorpos produzidos durante a imunização com nrRic c 3 (proteína natural recombinante) e mrRic c 3 (proteína mutante recombinante). Esta análise comprovou que os animais que foram imunizados com nrRic c 3, a produção de IgE e IgG1 foi maior do que no grupo tratado com mrRic c 3 (proteína mutante). Sabe-se que tanto IgE quanto IgG1 são anticorpos produzidos em reações de hipersensibilidade e está diretamente relacionada com o perfil Th2 alergênico (Focke-Tejkl et al., 2015).

Um estudo clínico foi realizado com pacientes não alérgicos ao pólen de bétula (Bet v 1) por 2 anos, onde foram administradas 3 doses da vacina contendo recombinantes hipoalergênicos com intervalo de 1 mês entre as doses por via subcutânea. Os pesquisadores observaram que a maioria dos pacientes imunizados com a vacina hipoalergênica recombinante induziu níveis de anticorpos IgG contra o alérgeno Bet v 1, sugerindo que esses anticorpos agem bloqueando a interação da IgE com o alérgeno (Campana et al., 2019).

Continuando nossas análises sobre o potencial alergênico das proteínas recombinantes, realizamos o ensaio de desgranulação de mastócitos. Aqui foi possível verificar que o potencial alergênico da proteína recombinante sem mutação (nrRic c 3) se manteve próximo ao controle positivo (pool de Albuminas 2S). No entanto, esta capacidade foi reduzida quando as células pré sensibilizadas foram incubadas com mrRic c 3, o que comprova que a alteração dos resíduos de aminoácidos impediu a ligação entre a IgE presente na membrana das células e a proteína mutada.

Nossos resultados contribuem para o estudo da eficácia da produção de proteínas recombinantes hipoalergênicas a partir de mutações em aminoácidos pontuais para o desenvolvimento de imunoterapia alérgeno-específica. Há ainda a necessidade de novas análises, como utilizando soro de pacientes que sejam alérgicos a algumas das fontes que apresentem reação cruzada com os alérgenos de *R. communis*.

Com isso é importante ressaltar que todo estudo de alergia baseia-se na importância do alérgeno para uma determinada população, sendo assim é fundamental a criação de banco de soros de pacientes sensibilizados para que se forneça um painel dos alérgenos predominantes no Brasil. Na Europa foram criadas redes integradoras que visam desde o controle e monitoramento do ar, como a rede europeia de aerobiologia, até a criação de banco de soros de pacientes alérgicos, com a finalidade de detectar as prevalências das respostas alérgicas (Chapman et al., 2008; Lupinek et al., 2015). Projetos como esses são escassos na pesquisa brasileira, porém possui grande relevância, pois visam o entendimento da sazonalidade dos aeroalérgenos e através do conhecimento do perfil da população alérgica haveria uma maior facilidade no direcionamento do desenvolvimento de vacinas imunomoduladoras para o tratamento e prevenção da doença alérgica (Pacheco-Soares et al., 2018).

Em síntese, perante a problemática das doenças alérgicas no Brasil, acreditamos que este trabalho contribuiu para elucidar mecanismos para novas abordagens terapêuticas a partir da produção de um hipoalérgeno.

6. Conclusão

Com o trabalho realizado podemos concluir que foi possível:

- Clonar e superexpressar Ric c 3 em forma de cadeia única, em um sistema de expressão bacteriano;
- Desenhar e sintetizar o fragmento gênico correspondente a Ric c 3 contendo mutações específicas (mrRic c 3) também em um sistema de expressão bacteriano;
- mrRic c 3 pode ser considerada um hipoalérgeno pois impediu a resposta Th2, induziu resposta Th1 e reduziu a desgranulação de mastócitos mediada por IgE.

Ric c 3 recombinante mutante apresenta potencial para a produção de vacinas para tratamento de pacientes alérgicos a mamona e a alérgenos que apresentam repostas cruzadas. Em sua totalidade, os resultados demonstraram que mrRic c 3 é uma proteína hipoalergênica que pode ser usada no desenvolvimento de AIT mais eficaz e segura.

7. Anexos

A. Sequência do gene sintético (construção nº 18AC5XNC) – Invitrogen by Thermo Fisher Scientific

Your GeneOptimizer Assisted Sequence Analysis

invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

Customer: **Universidade Estadual do Norte Fluminense, André Carvalho**
Gene name: **Ric_c3_mut_mari_2018**
Scientist: **HaiQuyen Arenskoetter**
Analyzed for expression in: **Non optimized**
Analysis created: **8/24/2018 (5:27 PM)**

Construct No: **18AC5XNC**
Gene length: **348 bp**
Ref. No: **2407008**



Analyzed with GeneOptimizer

GC Content



Average GC content: **48 %**

The plots show the GC content in a 40 bp window centered at the indicated nucleotide position.

GeneArt™'s gene optimization process is certified according to the standards of **ISO 9001** (registration no. 12 100 24212). Our internal quality management system covers all aspects from gene optimization to gene synthesis, DNA sequencing as well as sales and service. I certify to the best of my knowledge that: (1) no special safety precautions are needed for the production of the below mentioned DNA and (2) the below mentioned DNA sequence will be used in accordance with applicable laws and regulations.

I agree that the following sequence **18AC5XNC** shall be synthesized by Thermo Fisher Scientific according to the conditions described in the quotation.

date

signature

Sequence

Customer: **Universidade Estadual do Norte Fluminense, André Carvalho**

Gene name: **Ric_c3_mut_mari_2018**

Construct No: **18AC5XNC**

Gene length: **348 bp**

Optimized for expression in: **Non optimized**

Analysis created: **8/24/2018 (5:27 PM)**

```

                                     SacI
1  TTGTCAAAGGGTGAAAGGTTGGGATCGAGCTCGCAGCAATGCCGCCAGTTGGTTTCAGAGG
   +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AACAGTTTCCCACCTTCCAACCTAGCTCGAGCGTCGTTACGGCGGTCAACCAAGTCTCC
   L  S  K  G  E  R  L  G  S  S  S  Q  Q  C  R  Q  L  V  Q  R
   1   3   5   7   9   11  13  15  17  19

                                     SacI
61  AAGGACTTGAGCTCCTGCTTGCATACCTGAGGCAATCAAGTTCAAGAAGATCACCAGGA
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCCTGAACTCGAGGACGAACGCTATGGACTCCGTTAGTTCAAGTTCTTCTAGTGGTCCT
   K  D  L  S  S  C  L  R  Y  L  R  Q  S  S  S  R  R  S  P  G
   21  23  25  27  29  31  33  35  37  39

121  TTGTTGGTGTAAAGGATGCCTGGATTGTTGAACCAGCAGCAGGAGAGCCAGCAACTCCAG
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   AACCAACCACAATTCCTACGGACCTAACAACTTGGTCGTCCTCTCGGTCGTTGAGGTC
   L  L  V  L  R  M  P  G  L  L  N  Q  Q  Q  E  S  Q  Q  L  Q
   41  43  45  47  49  51  53  55  57  59

                                     PflMI
181  CAATGCTGCAATCAGGTAAGCAAGTAAGAGATGAATGCCAATGTTTGGCAATCAAATAT
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   GTTACGACGTTAGTCCATTTCGTTTCATCTCTACTTACGGTTACAAACCGTTAGTTTATA
   Q  C  C  N  Q  V  K  Q  V  R  D  E  C  Q  C  L  A  I  K  Y
   61  63  65  67  69  71  73  75  77  79

241  ATCGCATTGGATCAGATTCAGCAGGGACAGCTACATGGATTGTTGTCTTTGAGAGTGGCG
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   TAGCGTAACCTAGTCTAAGTCGTCCTGTCGATGTACCTAACACAGAACTCTCACCGC
   I  A  L  D  Q  I  Q  Q  G  Q  L  H  G  L  L  S  L  R  V  A
   81  83  85  87  89  91  93  95  97  99

                                     BspMI
                                     AarI
                                     SphI
301  CAGAGAGCAGGTGAAATGTATCTTCTTGGCGGTGTGCGTTGCATGCGC
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   GTCTCTCGTCCACTTTAACATAGAAGAACGCCACACGCAACGTACGGC
   Q  R  A  G  E  I  V  S  S  C  G  V  R  C  M  R
   101 103 105 107 109 111 113 115
```

B. Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR)



Nº 1425

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.046263/2021-20

APROVADO/APPROVAL: 19/10/2021 – R.O. 09/2021

TÍTULO: Expressão heteróloga, isolamento, caracterização estrutural e imunológica de Ric c 3 mutante, proteína derivada de um importante alérgeno de *Ricinus communis*.

TITLE: Heterologous expression, isolation, structural and immunological characterization of Ric c 3 mutant, a protein derived from a major allergen from *Ricinus communis*.

AUTORES/AUTHORS: Breno Castello Branco Beirão, Mariana Giarola Benedito Bartholazzi.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Patologia Básica

Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão
Coordenador da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI**, Institucional, em 28/10/2021, às 16:45, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida ajaj informando o código verificador 3979435 e o código CRC 087B8AAS.

8. Apêndices

Abaixo, as publicações que foram produzidas durante o desenvolvimento desta tese:

- Capítulo de livro: *Current developments in Allergen-Specific Immunotherapy: A brief review*. **IntechOpen**. DOI: 10.5772/intechopen.106280

Autores: Mariana Giarola Benedito Bartholazzi, Tatiana de Morais Lodi e Olga Lima Tavares Machado

- Artigo submetido ao periódico **Clinical & Experimental allergy**.

Título: *Production of a Ric c3 hypo-allergen with no IgE binding or anaphylactogenic activity*.

Autores: Mariana Giarola Benedito Bartholazzi, Tatiana de Morais Lodi, Eloise de Souza Mello, André de Oliveira Carvalho, Breno Castello Branco Beirão e Olga Lima Tavares Machado.

9. Referências Bibliográficas

- Aalberse, R. C. (2000). Structural biology of allergens. *Molecular Mechanisms in Allergy and Clinical Immunology*, 106(2).
<https://doi.org/10.1067/mai.2000.108434>
- Akdis, C. A. (2006). Allergy and hypersensitivity. Mechanisms of allergic disease. *Current Opinion in Immunology*, 18(6), 718–726.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.09.016>
- Akdis, C. A., & Akdis, M. (2014). Mechanisms of immune tolerance to allergens: Role of IL-10 and Tregs. *Journal of Clinical Investigation*, 124(11), 4678–4680.
<https://doi.org/10.1172/JCI78891>
- Amato, G. D. (2006). Role of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) in the treatment of bronchial asthma and allergic respiratory diseases. 533, 302–307.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.045>
- Basu, A., Sarkar, A., & Basak, P. (2018). Immunoinformatics Based Vaccine Design for Zea M 1 Pollen Allergen. 10(3), 260–266.
<https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.59>
- Blank, U., Charles, N., & Benhamou, M. (2015). The high-affinity immunoglobulin E receptor as pharmacological target. *European Journal of Pharmacology*, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.070>
- Breiteneder, H., & Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal Allergy and Clinical Immunology*, 113, 821–830.
- Breiteneder, Heimo, & Clare Mills, E. N. (2005). Plant food allergens--structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, 23(6), 395–399.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.05.004>
- Bufe, A. (2001). Significance of IgE-binding epitopes in allergic disease. *Journal Allergy Clin Immunol*. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.112850>
- Burks, A. W., Calderon, M. A., Casale, T., Cox, L., Demoly, P., Jutel, M., Nelson, H., & Akdis, C. A. (2013). Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(5). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.049>
- Campana R, Marth K, Z. P., & Weber M, Lupinek C, Zhernov Y, et al. (2019). Vaccination of nonallergic individuals with recombinant hypoallergenic fragments of birch pollen allergen Bet v 1: Safety, effects, and mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143, 1258–1261.
- Campos-Mesquita, D. M. (2020). Avaliação do bloqueio de IgE com ácido L-glutâmico como abordagem alternativa para o tratamento de doenças alérgicas.
- Chapman, M. D., Ferreira, F., Villalba, M., Cromwell, O., & Bryan, D. (2008). The European Union CREATE Project: A model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol*, 122(5).
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.07.030>
- Chavez, E. F. D., & Alva, E. V. (2022). CARACTERIZACIÓN DE ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y MANEJO DE ANTIHISTAMÍNICOS EN ESTABLECIMIENTOS FARMACÉUTICOS DEL BARRIO SAN PEDRO, CAJAMARCA, 2022.
- Church, D. S., & Church, M. K. (2013). *Pharmacology of Antihistamines*. 58(3), 219–224.
- Cooke, R. A. ., Barnard, J. H. ., Hebal, S., & Stull, A. (1935). Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever)*. 1.
- Cromwell, O., Häfner, D., & Nandy, A. (2011). Recombinant allergens for specific

- immunotherapy*. 865–872. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.047>
- da Silva, J. G., Machado, O. L., Izumi, C., Padovan, J. C., Chait, B. T., Mirza, U. a, & Greene, L. J. (1996). Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), 10–18. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0526>
- Deus-de-Oliveira, N., Felix, S. P., Carrielo-Gama, C., Fernandes, K. V., DaMatta, R. A., & Machado, O. L. T. (2011a). Deus-de-Oliveira, N., Felix, S. P., Carrielo-Gama, C., Fernandes, K. V., DaMatta, R. A., & Machado, O. L. T. (2011). Identification of critical Amino acids in the IgE epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the application of Glutamic acid as an IgE blocker. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021455>
- Deus-de-Oliveira, N., Felix, S. P., Carrielo-Gama, C., Fernandes, K. V., DaMatta, R. A., & Machado, O. L. T. (2011b). Identification of critical Amino acids in the IgE epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the application of Glutamic acid as an IgE blocker. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021455>
- Dorofeeva, Y., Shilovskiy, I., Tulaeva, I., Focke-tejkl, M., Flicker, S., Kudlay, D., Khaitov, M., Karsonova, A., Riabova, K., Karaulov, A., Khanferyan, R., Pickl, W. F., Wekerle, T., & Valenta, R. (2021). *Past, present, and future of allergen immunotherapy vaccines. March 2020*, 131–149. <https://doi.org/10.1111/all.14300>
- Felix, S. P. (2007). *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.*
- Felix, S. P., Mayerhoffer, R. O., Damatta, R. A., Verícimo, M. A., Nascimento, V. V., & Machado, O. L. T. (2008). Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. *Peptides*, 29(4), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.12.013>
- Focke-Tejkl, M., Weber, M., Niespodziana, K., Neubauer, A., Huber, H., Henning, R., Stegellner, G., Maderegger, B., Hauer, M., Stolz, F., Niederberger, V., Marth, K., Eckl-Dorna, J., Weiss, R., Thalhamer, J., Blatt, K., Valent, P., & Valenta, R. (2015). Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5), 1207-1217.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.09.012>
- Garcia-Gonzalez, & et al. (1999). Pollinosis to *Ricinus communis* (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study. *Clinical Experimental Allergy*, 29(9), 1265–1275.
- Gräslund, S., & et al. (2008). Protein production and purification. *Nat Methods*, 5(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>
- Gunawardana, N. C., & Durham, S. R. (2018). New approaches to allergen immunotherapy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 121(3), 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.07.014>
- Hamilton, R. G., Macglashan, D. W., & Sarbjit, J. (2010). *IgE antibody-specific activity in human allergic disease. January*, 273–284. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8160-3>
- Holgate, S. T., & Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology*, 8(3), 218–230. <https://doi.org/10.1038/nri2262>
- Iguchi, N., Takeda, Y., Sato, N., Ukichi, K., Katakura, A., Ueda, K., Narushima, T., Higuchi, S., & Ogasawara, K. (2016). International Immunopharmacology The antihistamine olopatadine regulates T cell activation in palladium allergy.

- International Immunopharmacology*, 35, 70–76.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.021>
- Irwin, S. D., Keen, J. N., Findlay, J. B., & Lord, J. M. (1990). The Ricinus communis 2S albumin precursor: a single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. *Molecular & General Genetics : MGG*, 222(2–3), 400–408. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2274038>
- Ivanciuc, O., Midoro-Horiuti, T., Schein, C. H., Xie, L., Hillman, G. R., Goldblum, R. M., & Braun, W. (2009). The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. *Molecular Immunology*, 46(5), 873–883.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.09.004>
- Jacobsen, L., Niggemann, B., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halcken, S., Koivikko, A., Norberg, L. A., Valovirta, E., & Wahn, U. (2007). *Original article Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma : 10-year follow-up on the PAT study.* 8, 943–948.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01451.x>
- Jensen, A. N., & Canonica, G. W. (2017). *Debates in allergy medicine : Molecular allergy diagnosis with ISAC will replace screenings by skin prick test in the future.* 1–6. <https://doi.org/10.1186/s40413-017-0162-3>
- Jongejan, L., Ree, R. Van, Poulsen, L. K., & Ree, R. Van. (2016). immunotherapy Hypoallergenic molecules for subcutaneous immunotherapy. *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(1), 5–7.
<https://doi.org/10.1586/1744666X.2016.1103182>
- Jutel, M., Agache, I., Bonini, S., Burks, A. W., Calderon, M., Canonica, W., Cox, L., Demoly, P., Frew, A. J., O’Hehir, R., Kleine-Tebbe, J., Muraro, A., Lack, G., Larenas, D., Levin, M., Nelson, H., Pawankar, R., Pfaar, O., Van Ree, R., ... Akdis, C. A. (2015). International consensus on allergy immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3).
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.047>
- Jutel, M., & Akdis, C. A. (2014). Novel immunotherapy vaccine development. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 14(6), 557–563.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000121>
- Kreis, M., Forde, B. G., Rahman, S., Mifflin, B. J., & Shewry, P. R. (1985). Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of Molecular Biology*, 183(3), 499–502. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90017-8)
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227.
<https://www.nature.com/articles/227680a0.pdf>
- Leung, D. Y. M., Bieber, T., Johansson, S., Hourihane, J., Bousquet, J., al., et, Schultz-Larsen, F., Hanifin, J., Taylor, B., Wadsworth, J., Wadsworth, M., Peckham, C., Williams, H., Robertson, C., Stewart, A., al., et, Schäfer, T., Krämer, U., Vieluf, D., ... Higgins, E. (2003). Atopic dermatitis. *Lancet (London, England)*, 361(9352), 151–160. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12193-9)
- Linhart, B., & Valenta, R. (2012). Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. *Vaccine*, 30(29), 4328–4335.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.011>
- Loh, W., & Tang, M. (2018). Adjuvant therapies in food Immunotherapy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38(1), 89–101.
- Lupinek, C., Wollmann, E., Baar, A., & Banerjee, S. (2015). *Europe PMC Funders Group Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring*

- of allergy: The MeDALL allergen-chip*. 66(1), 106–119.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.10.008>. Advances
- Marth, K., Focke-Tejkl, M., Lupinek, C., Valenta, R., & Niederberger, V. (2014). Allergen Peptides, Recombinant Allergens and Hypoallergens for Allergen-Specific Immunotherapy. *Current Treatment Options in Allergy*, 1(1), 91–106.
<https://doi.org/10.1007/s40521-013-0006-5>
- Moreno, F. J., & Clemente, A. (2008). 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *The Open Biochemistry Journal*, 2, 16–28.
<https://doi.org/10.2174/1874091X00802010016>
- Mueller, G. A. (2017). *Contributions and Future Directions for Structural Biology in the Study of Allergens*. 27709, 57–66. <https://doi.org/10.1159/000481078>
- Nascimento, V. V. (2009). *Ricinus communis L. como inibidores de α -amilase e relação estrutura-atividade de suas principais isoformas, Ric c 1 e Ric c 3*.
- Navarro, B., Alarcón, E., Claver, Á., Pascal, M., Perales, A. D., & Bahima, A. C. (2019). Oral immunotherapy with peach juice in patients allergic to LTPs. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13223-019-0374-x>
- Noon, L. (1911). *Prophylactic inoculation against hay fever*. 1572–1573.
- Novak, N., Mete, N., Bussmann, C., Maintz, L., & Bieber, T. (n.d.). *Mechanisms of allergy and clinical immunology Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2*. 2–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.039>
- Oliveira, N. D. De, Lima, O., & Machado, T. (2014). *Allergens and Toxins from Oleaginous Plants: Problems and Solutions*. September 2011.
<https://doi.org/10.5772/18020>
- Ozdemir, C., Kucuksezer, U. C., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2016). Mechanisms of Aeroallergen Immunotherapy: Subcutaneous Immunotherapy and Sublingual Immunotherapy. In *Immunology and Allergy Clinics of North America* (Vol. 36, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.08.003>
- Pacheco-Soares, Thaís; Carvalho, A. de O., Araújo, J. da S., & Machado, O. L. T. (2018). A modified , hypoallergenic variant of the *Ricinus communis* Ric c1 protein retains biological activity. *Portland Press*, 0(February), 1–13.
- Pacheco-Soares, T. (2014). *Expressão de Ric c 1, um importante alérgeno de Ricinus comunnis em Escherichia coli e mutações em seus epitopos alergênicos*.
- Pantoja-uceda, D., Bruix, M., Gime, G., Rico, M., & Santoro, J. (2003). *Solution Structure of RicC3, a 2S Albumin Storage Protein from*. 13839–13847.
- Petrova, S. Y., Khlgatian, S. V, Svirshchevskaya, E. V, Vasilyeva, A. V, & Berzhets, V. M. (2021). *DNA vaccines and recombinant allergens with reduced allergenic activity treat allergies*. 10(1). <https://doi.org/10.15275/rusomj.2021.0102>
- Pfaar, O., Agache, I., Blay, F. De, Bonini, S., Durham, M. C. S. R., Gawlik, R., Hellings, P. W., Roberts, G., Schmidt-weber, A. S. C. B., Willers, C., Ziegelmayer, P., & Akdis, C. A. (2019). *Perspectives in allergen immunotherapy: 2019 and beyond*. 74(September), 3–25. <https://doi.org/10.1111/all.14077>
- Raith, M., Zach, D., Sonnleitner, L., Woroszylo, K., Focke-tejkl, M., Wank, H., Graf, T., Kuehn, A., Pascal, M., Muñoz-cano, R. M., Wortm, J., Aschauer, P., Keller, W., Braeuer, S., Goessler, W., & Swoboda, I. (2019). *Rational design of a hypoallergenic Phl p 7 variant for immunotherapy of polcalcin-sensitized patients*. May, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44208-0>
- Robinson, D. S., Larché, M., Durham, S. R., Robinson, D. S., Larché, M., & Durham, S. R. (2004). *Review series Tregs and allergic disease*. 114(10), 1389–1397.

- <https://doi.org/10.1172/JCI200423595>. The Sackesen, C., Veen, W. Van De, Akdis, M., Soyer, O., Zumkehr, J., Ruckert, B., & Stanic, B. (2013). *Suppression of B-cell activation and IgE, IgA, IgG1 and IgG4 production by mammalian telomeric oligonucleotides*. 68, 593–603. <https://doi.org/10.1111/all.12133>
- Santos, S. P. O., Lisboa, A. B. P., Silva, F. S. R., Tiwari, S., Azevedo, V., Cruz, Á. A., Silva, E. S., Pinheiro, C. S., Alcantara-Neves, N. M., & Pacheco, L. G. C. (2022). Rationally designed hypoallergenic mutant variants of the house dust mite allergen Der p 21. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1866(4).
- Satitsuksanoa, P., Anna, G., Jansen, K., Veen, W. Van De, & Akdis, M. (2018). *Modified Allergens for Immunotherapy*.
- Senti, G., Johansen, P., Martinez-Gomez, J., Prinz Varicka, B. M., & Kündig, T. M. (2005). Efficacy and Safety of Allergen-Specific Immunotherapy in Rhinitis, Rhinoconjunctivitis, and Bee / Wasp Venom Allergies. *International Reviews of Immunology*, 24, 519–531. <https://doi.org/10.1080/08830180500370944>
- Shamji, M. H., & Durham, S. R. (2017). Mechanisms of allergic diseases Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(6), 1485–1498. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.010>
- Shewry, P. R., Beaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S., & Mills, E. N. C. (2002). Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochemical Society Transactions*, 30, 906–910. <https://doi.org/10.1042/>
- Simons, F. E. R., & Simons, K. J. (2008). *H1 Antihistamines - Current Status and Future Directions*. September, 145–155.
- Spertini, F., DellaCorte, G., Kettner, A., de Blay, F., Jacobsen, L., Jutel, M., Worm, M., Charlon, V., & Reymond, C. (2016). Efficacy of 2 months of allergen-specific immunotherapy with Bet v 1–derived contiguous overlapping peptides in patients with allergic rhinoconjunctivitis: Results of a phase IIb study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.044>
- Stefan, S., Kirsten, K., Sonja, W., Nadine, D., Andrea, W., Andreas, R., Peter, B., Isabel, P., Gabriele, G., Fatima, F., Stefan, V., Masako, T., & Stephan, S. (2017). Conjugation of wildtype and hypoallergenic mugwort allergen Art v 1 to flagellin induces IL-10-DC and suppresses allergen-specific TH2-responses in vivo. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11972-w>
- Su, Y., Connolly, M., Marketon, A., & Heiland, T. (2016). *CryJ-LAMP DNA Vaccines for Japanese Red Cedar Allergy Induce Robust Th1-Type Immune Responses in Murine Model*. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4857869>
- Tanabe, S. (2007). *Epitope Peptides and Immunotherapy*. 109–118.
- Telles-Filho, P. d'Almeida. (2022). *Asma Brônquica*.
- Towbin, H., Staehelint, T., & Gordon, J. (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography)*. 76(9), 4350–4354. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC411572/pdf/pnas00009-0198.pdf>
- Valenta, R., Campana, R., Focke-Tejkl, M., & Niederberger, V. (2016). Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. *The Journal of Allergy and Clinical*

- Immunology*, 137(2), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1299>
- Valenta, R., Ferreira, F., Focke-Tejkl, M., Linhart, B., Niederberger, V., Swoboda, I., & Vrtala, S. (2010). From Allergen Genes to Allergy Vaccines. *Annual Review of Immunology*, 28(1), 211–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101218>
- Valenta, R., Karaulov, A., Niederberger, V., Gattinger, P., van Hage, M., Flicker, S., Linhart, B., Campana, R., Focke-Tejkl, M., Curin, M., Eckl-Dorna, J., Lupinek, C., Resch-Marat, Y., Vrtala, S., Mittermann, I., Garib, V., Khaitov, M., Valent, P., & Pickl, W. F. (2018). Molecular Aspects of Allergens and Allergy. In *Advances in Immunology* (Vol. 138). <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.03.002>
- Valovirta, E. (2011). *Effect of AIT in children including potential to prevent the development of asthma*. 66, 53–54. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02640.x>
- van Zelm, M. C., McKenzie, C. I., Varese, N., Rolland, J. M., & O’Hehir, R. E. (2021). Advances in allergen-specific immune cell measurements for improved detection of allergic sensitization and immunotherapy responses. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76(11), 3374–3382. <https://doi.org/10.1111/all.15036>
- Wang, X. Y., Lim-jurado, M., Prepageran, N., Tantilipikorn, P., & Wang, D. Y. (2016). *Treatment of allergic rhinitis and urticaria : a review of the newest antihistamine drug bilastine*. 585–597.
- Ward, D. E., Fay, B. L., Adejuwon, A., Han, H., & Ma, Z. (2018). *Chimeric Antigen Receptors Based on Low Affinity Mutants of Fc ϵ RI Re-direct T Cell Specificity to Cells Expressing Membrane IgE*. 9(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02231>
- Youle, R. J., & Huang, A. H. (1978). Evidence that the castor bean allergens are the albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant Physiology*, 61(6), 1040–1042. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16660413>
- Zhernov, Y., Curin, M., Khaitov, M., Karaulov, A., & Valenta, R. (n.d.). *CURRENT OPINION Recombinant allergens for immunotherapy: state of the art*. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000536>