

PROSPECÇÃO DE UMA IMUNOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DE ALERGIAS
ALIMENTARES E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS BASEADAS EM ESTUDOS *IN SÍLICO*
DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B E T ATRAVÉS DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

TATIANA DE MORAIS LODI

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Agosto - 2023

PROSPECÇÃO DE UMA IMUNOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DE ALERGIAS ALIMENTARES E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS BASEADAS EM ESTUDOS *IN SÍLICO* DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B E T ATRAVÉS DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

TATIANA DE MORAIS LODI

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 Doutora em Biociências e Biotecnologia.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Agosto - 2023

PROSPECÇÃO DE UMA IMUNOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DE ALERGIAS ALIMENTARES E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS BASEADAS EM ESTUDOS *IN SÍLICO* DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B E T ATRAVÉS DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

TATIANA DE MORAIS LODI

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 Doutora em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 29/08/2023

Comissão examinadora:

Dr. Maurício Afonso Verícimo - UFF

Dr^a. Alba Lucínia Peixoto Range - UENF

Dr. Milton Masahiko Kanashiro - UENF

Dr^a. Olga Lima Tavares Machado – UENF

(Orientadora)

Este trabalho foi realizado no 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 Professora Dr^a. Olga Lima Tavares Machado.

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).

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, sem Ele nada disso seria possível. Dedico também ao meu saudoso Pai que tinha orgulho de que um dia eu seria uma doutora, a minha querida Mãe e ao meu amado Esposo.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente à Deus pela minha vida, pela oportunidade de ter realizado este trabalho, pela força e sustento diante dos momentos de fraquezas e dificuldades. Obrigada por tudo meu Senhor.

E ao longo desses anos todos do doutorado, de muito estudo e dedicação, eu gostaria de agradecer a tantas pessoas que estiveram comigo, me acompanhando, doando seu tempo, me incentivando para que eu chegasse até aqui. Assim, através de palavras que saem do meu coração, eu me expesso para demonstrar a minha gratidão a todos.

Agradeço ao meu saudoso e amado pai, que tanto queria que esse dia chegasse. Mas hoje ele me vê lá de cima, e tenho certeza que ele está com um sorriso bem largo no rosto de alegria e me aplaudindo. Agradeço a minha querida e amada mãe por tudo, por todo esforço e dedicação para me educar e incentivar nos estudos, por doar a sua vida pela nossa família, por ser exemplo de garra e fé.

Agradeço ao meu amado esposo Júnior, por todo amor, companheirismo, pela compreensão nos momentos difíceis, por acreditar em mim e sempre me incentivar.

E agradeço a todos os meus irmãos, familiares e amigos pelo carinho, pela torcida e orações.

A minha orientadora Dr^a. Olga Lima Tavares Machado por me permitir realizar o doutorado sob suas orientações. Eu lhe agradeço por tudo, pela orientação, por compartilhar seus conhecimentos e experiências, pela paciência e compreensão comigo nos momentos em que eu mais precisei.

Aos membros da banca, Dr^a Alba Lucínia Peixoto Rangel, Dr. Milton Masahiko Kanashiro e Dr. Maurício Afonso Verícimo pela atenção e disponibilidade.

A revisora deste trabalho, Dr^a. Rebeka da Conceição Souza por toda atenção e dedicação em revisar minha tese.

Aos doutores Giliane da Silva de Souza, Rebeka da Conceição Souza e Fabrício Moreira Almeida, e a mestre e técnica Juliana Azevedo da Silva, do Laboratório de Biologia do Reconhecer da UENF, que aceitaram ser colaboradores do meu trabalho, sempre com muita disponibilidade e paciência em me ajudar nos experimentos. Gratidão por tudo.

A Dr^a. Jucélia Araújo pela parceria, amizade, paciência, dedicação em me ensinar, disponibilidade, pelas palavras de carinho e conforto em todos os momentos que precisei, meu muito obrigada! Você é uma pessoa iluminada.

A Ana Flávia por toda ajuda com as imunizações, com os monitoramentos e cuidados com os animais, muito obrigada!

A todas as minhas amigas do laboratório, sou muito grata pela amizade e parceria, carinho, pelas palavras e abraços, pelo aprendizado e convivência.

A Isabela Dantes por nos ajudar com os materiais do laboratório, pelo carinho, cuidado e amizade, obrigada por tudo!

Ao Cristovão por tanto ter me ajudado com as liofilizações de minhas amostras, muito obrigada!

Aos professores, funcionários, colegas do LQFPP, secretárias da Pós-graduação, obrigada por toda ajuda e convivência.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, pela oportunidade e por me proporcionar condições para a realização deste trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro concedido ao longo deste trabalho. Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

Tenho aprendido...

*Que se aprende errando;
Que crescer não significa fazer aniversário;
Que o silêncio, às vezes, é a melhor resposta;
Que trabalhar significa não só ganhar dinheiro;
Que o dinheiro não compra classe;
Que amigos a gente conquista mostrando o que somos;
Que os verdadeiros amigos ficam até o fim;
Que a maldade se esconde atrás de uma bela face;
Que devemos sempre ter palavras doces e gentis, pois amanhã talvez tenhamos que
engoli-las;
Que não se espera a felicidade chegar, mas se procura por ela;
Que quando penso saber tudo, ainda não aprendi nada;
Que a natureza é a coisa mais bela da vida;
Que amar significa se dar por inteiro;
Que ninguém é perfeito, até que você se apaixone por esta pessoa;
Que um só dia pode ser muito importante que muitos anos;
Que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;
Que ouvir uma palavra de carinho faz bem à saúde e, às vezes, é tudo que
precisamos;
Que dar carinho também faz;
Que ser gentil é mais importante do que estar sempre certo;
Que sonhar é preciso;
Que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo o que pedimos;
Que Deus não fez tudo num só dia, o que me faria pensar que eu podia?
Que se deve ser criança a vida toda;
Que não importa a seriedade que a vida exija de você, precisamos de um amigo
brincalhão;
Que o julgamento alheio não é importante;
Que se você se nivelar a alguém, só permitirá que essa pessoa continue a magoar
você;
Que nem sempre posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a
respeito;
Que o que realmente importa é a paz interior;*

*Que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento
ocorrem quando você está escalando-a;*

Que não se precisa morrer para aprender a viver.

E, finalmente, tenho aprendido que...

Quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer.

(adaptado de William Sheakespeare)

RESUMO

A alergia alimentar é uma reação adversa à alimentos que envolve eventos imunológicos considerada um problema de saúde pública. As oleaginosas comestíveis apresentam na sua composição proteínas alergênicas da classe das albuminas 2S. O índice de alergia alimentar está aumentando e o tratamento farmacológico consiste no uso de antialérgicos, que apenas reduzem os sintomas da doença, e nas imunoterapias com extratos padronizados, que por conterem outras proteínas alergênicas, podem ocasionar reações adversas. Para minimizar os impactos da alergia alimentar é fundamental o desenvolvimento de tratamentos personalizados. Assim, torna-se necessário a compreensão dos alérgenos e a caracterização dos epítomos ligantes de IgE e de células B e T. Realizamos neste trabalho um estudo *in silico* dos alérgenos da classe das albuminas 2S presentes no amendoim, gergelim, nozes, castanha de caju, castanha do Brasil, avelã e pistache. Através do banco de dados PDB obtivemos as sequências dos alérgenos utilizadas para a predição do peptídeo sinal no software *SignalP* 5.0, que posteriormente foram alinhadas no software Clustal Omega, priorizando o alinhamento dos resíduos de cisteína e destacando as regiões conservadas entre os alérgenos. As propriedades físico-químicas foram preditas no software *ProtParam*, demonstrando proteínas de baixa massa molecular. As estruturas secundárias foram preditas no software PHD, destacando a predominância de α -hélices. Os epítomos de células B foram preditos nos softwares *Bepipred-IEDB*, *BcePred* e *BCPreds*, e os epítomos de células T no NetMHCII. A partir destas análises, projetamos um peptídeo quimérico que contém epítomos de células T derivados dos alérgenos de pistache, gergelim, castanha de caju e amendoim. A estrutura secundária do peptídeo foi predita no software PHD, demonstrando uma estrutura rica em α -hélices, e determinada por espectrometria de dicroísmo circular, que revelou estruturas alfa helicoidais e estruturas secundárias não ordenadas. A antigenicidade foi avaliada pelo software *ANTIGENpro*, apresentando baixo potencial de antigenicidade, e pelo *Predicted Antigenic Peptides*, destacando um fragmento na sequência com ação antigênica. O peptídeo quimérico foi sintetizado, e definimos então que o gergelim e amendoim, que são duas oleaginosas comumente consumidas, prosseguissem com a extração, purificação e caracterização das proteínas. A partir das proteínas albuminas 2S e do peptídeo sintético, ensaios *in vivo* e *in vitro* de proliferação de células T foram realizados. Observamos uma resposta proliferativa um pouco superior nos animais sensibilizados com amendoim. Já para os animais tratados *in vivo* com o peptídeo, a proliferação celular foi superior nos animais sensibilizados com gergelim e estimulados *in vitro* com o peptídeo. O tratamento com o peptídeo quimérico reduziu os níveis de IgG1 e IgE, e a avaliação do seu efeito sobre a produção de citocinas demonstrou sua potencial ação imunomoduladora, considerando ser um bom candidato para imunoterapia.

Palavras-chave: albumina 2S, alergia, epítomo, imunoterapia, oleaginosas comestíveis.

ABSTRACT

Food allergy is an adverse reaction to food that involves immunological events and is considered a public health problem. Edible oilseeds contain allergenic proteins from the 2S albumin class. The rate of food allergy is increasing and pharmacological treatment consists of the use of antiallergic drugs, which only reduce the symptoms of the disease, and immunotherapies with standardized extracts, which, as they contain other allergenic proteins, can cause adverse reactions. To minimize the impacts of food allergies, it is essential to develop personalized treatments. Therefore, it is necessary to understand allergens and characterize the IgE binding epitopes and B and T cell epitopes. In this work, we carried out an *in silico* study of allergens from the 2S albumin class present in peanuts, sesame, walnuts, cashew nuts, Brazil nuts, hazelnuts and pistachios. Using the PDB database, we obtained the allergen sequences used to predict the signal peptide in the SignalP 5.0 software, which were subsequently aligned in the Clustal Omega software, prioritizing the alignment of cysteine residues and highlighting the conserved regions between the allergens. The physicochemical properties were predicted using the ProtParam software, demonstrating low molecular mass proteins. The secondary structures were predicted using the PHD software, highlighting the predominance of α -helices. B cell epitopes were predicted in Bepipred-IEDB, BcePred and BCPreds software, and T cell epitopes in NetMHCII. From these analyses, we designed a chimeric peptide that contains T cell epitopes derived from pistachio, sesame, cashew and peanut allergens. The secondary structure of the peptide was predicted in the PHD software, demonstrating a structure rich in α -helices, and determined by circular dichroism spectrometry, which revealed alpha helical structures and unordered secondary structures. Antigenicity was evaluated by the ANTIGENpro software, showing low antigenicity potential, and by Predicted Antigenic Peptides, highlighting a fragment in the sequence with antigenic action. The chimeric peptide was synthesized, and we then decided to use sesame and peanuts, which are two commonly consumed oilseeds, to proceed with the extraction, purification and characterization of the proteins. Using the 2S albumin proteins and the synthetic peptide, *in vivo* and *in vitro* T cell proliferation assays were performed. We observed a slightly higher proliferative response in animals sensitized with peanuts. For animals treated *in vivo* with the peptide, cell proliferation was higher in animals sensitized with sesame and stimulated *in vitro* with the peptide. Treatment with the chimeric peptide reduced the levels of IgG1 and IgE, and the evaluation of its effect on the production of cytokines demonstrated its potential immunomodulatory action, considering it to be a good candidate for immunotherapy.

Keywords: 2S albumin, allergy, epitope, immunotherapy, edible oilseeds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura terciária do alérgeno recombinante de mamona, Ric c 3.....	27
Figura 2 - Processo do desenvolvimento da alergia.....	33
Figura 3 - Representação esquemática do epítopo.....	37
Figura 4 - O receptor de células T é um heterodímero semelhante ao fragmento Fab do anticorpo.....	39
Figura 5 - Sequências dos alérgenos (pólen, Bet v 1.0201, maçã, Mal d 1.0108 e avelã, Cor a 1.0401).....	43
Figura 6 - Molécula do MHC I.....	50
Figura 7 - Molécula do MHC II.....	50
Figura 8 - Esquema representativo da metodologia do estudo <i>in silico</i> simplificada.....	53
Figura 9 - Cronograma esquemático da sensibilização de camundongos.....	59
Figura 10 - Cronograma esquemático da sensibilização e investigação de epítomos de células T.....	60
Figura 11 - Cronograma esquemático da sensibilização de camundongos e do tratamento com o peptídeo híbrido de células T.....	63
Figura 12 - Predição de peptídeo sinal.....	64
Figura 13 - Alinhamento múltiplo das sequências primárias dos alérgenos de amendoim (Ara h 2 e 6), pistache (Pis v 1), castanha de caju (Ana o 3), gergelim (Ses i 1), castanha do Brasil (Ber e 1), avelã (Cor a 14) e noz (Jug r 1).....	66
Figura 14 - Visualização no programa <i>Jalview</i> do múltiplo alinhamento das sequências proteicas dos alérgenos das oleaginosas realizado no software Clustal Ômega.....	68
Figura 15 - Árvore filogenética resultante do método <i>Neighbor-joining</i> obtida pelo CLUSTAL ÔMEGA.....	69
Figura 16 - Estruturas secundárias dos alérgenos preditas pelo software PHD.....	71
Figura 17 - Frequência dos tipos de estrutura secundária predita pelo software PHD. Alérgenos de amendoim (Ara h 6 e Ara h 2), castanha do Brasil (Ber e 1), gergelim (Ses i 1), castanha de caju (Ana o 3), pistache (Pis v 1), avelã (Cor a 14) e noz inglesa (Jug r 1).....	72
Figura 18 - Epítomos de células B preditos pelo método Bepipred demonstrando o gráfico da escala de propensão.....	73
Figura 19 - Epítomos de células B preditos pelo método BcePred.....	74
Figura 20 - Previsões de epítomos de células B através do método BCPred.....	74

Figura 21 – Número de epítomos de células B preditos para os alérgenos de acordo com os métodos de predição <i>Bepipred</i> , <i>BcePred</i> – Hidrofobicidade, <i>BcePred</i> - Flexibilidade, <i>BcePred</i> – Superfície Exposta, <i>BcePred</i> – Polaridade e <i>BCPred</i>	75
Figura 22 - Número de epítomos de células T classificados como fortes ligantes preditos de acordo com a afinidade dos alérgenos aos 14 tipos de alelos de HLA - DR calculado pelo método de redes neurais NetMHCII (referente ao MHC da classe II).....	78
Figura 23 - Número de epítomos de células T classificados como fracos ligantes preditos de acordo com a afinidade dos alérgenos aos 14 tipos de alelos de HLA - DR calculado pelo método de redes neurais NetMHCII (referente ao MHC da classe II).....	80
Figura 24 - Diagrama esquemático do peptídeo híbrido de células T composto por regiões imunogênicas dos alérgenos de gergelim (<i>Ses i 1</i>), amendoim (<i>Ara h 6</i>), pistache (<i>Pis v 1</i>) e castanha de caju (<i>Ana o 3</i>).....	81
Figura 25 - Predição da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T através do software PHD.....	83
Figura 26 - Determinação da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T por espectrometria de dicroísmo circular.....	84
Figura 27 - Previsão de antigenicidade para o peptídeo híbrido de células T obtido pelo software <i>Predicted Antigenic Peptides</i>	85
Figura 28 - Perfil cromatográfico da cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G50) do extrato bruto de sementes de amendoim.....	86
Figura 29 - Perfil cromatográfico da cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G50) do extrato bruto de sementes de gergelim.....	86
Figura 30 - Perfil proteico das frações de gergelim e amendoim.....	87
Figura 31 – Produção de IgG, IgG1 e IgE específica anti-albumina 2S de gergelim obtidos nos soros de camundongos sensibilizados com 50 µg de albumina 2S de gergelim.....	88
Figura 32 – Produção de IgG, IgG1 e IgE específica anti-albumina 2S de amendoim obtidos nos soros de camundongos sensibilizados com 50 µg de albumina 2S de gergelim.....	88
Figura 33 – Resposta proliferativa das células do baço às proteínas albuminas 2S de gergelim (PG) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp).....	89
Figura 34 – Resposta proliferativa das células do baço às proteínas albuminas 2S de amendoim (PA) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp).....	90
Figura 35 - Produção de TNF- α das células do baço estimuladas às proteínas albuminas 2S de gergelim (PG) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp).....	91
Figura 36 – Produção de TNF- α das células do baço estimuladas às proteínas albuminas 2S de amendoim (PA) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp).....	92

Figura 37 – Produção de INF- γ das células do baço estimuladas às proteínas albuminas 2S de gergelim (PG) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp).....	92
Figura 38 - Produção de INF- γ das células do baço estimuladas às proteínas albuminas 2S de amendoim (PA) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp).....	93
Figura 39 – Comparação da produção de IgG, IgG1 e IgE específica anti-albumina 2S de gergelim obtidos nos soros de camundongos sensibilizados com 40 μ g de albumina 2S de gergelim e tratados com o peptídeo híbrido.....	94
Figura 40 – Comparação da produção de IgG, IgG1 e IgE específica anti-albumina 2S de amendoim obtidos nos soros de camundongos sensibilizados com 40 μ g de albumina 2S de amendoim e tratados com o peptídeo híbrido.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista oficial dos alérgenos presentes nas oleaginosas.....	28
Tabela 2 - Sequências proteicas dos alérgenos sem o peptídeo sinal.....	65
Tabela 3 – Características físico-químicas dos alérgenos obtidas <i>in silico</i> pelo programa <i>ProtParam</i>	70
Tabela 4 – Compilado de epítomos de células B preditos e comuns nos três softwares <i>Bepipred</i> , <i>BcePred</i> e <i>BCPred</i>	76
Tabela 5 - Afinidade de ligação dos alérgenos das oleaginosas aos diferentes tipos de alelos de HLA calculado pelo método de redes neurais NetMHCII classificados como fortes ligantes.....	77
Tabela 6 - Afinidade de ligação dos alérgenos aos diferentes tipos de alelos de HLA calculado pelo método de redes neurais NetMHCII classificados como fracos ligantes.....	79
Tabela 7 - Núcleo de ligação de epítomos de células T, epítomos de células B e epítomos ligantes de IgE de alérgenos de (Pis v 1), gergelim (Ses i 1), castanha de caju (Ana o 3).....	81
Tabela 8 – Características físico-químicas do peptídeo híbrido de células T obtidas <i>in silico</i> pelo programa <i>ProtParam</i>	82
Tabela 9 - Verificação do grau de antigenicidade do peptídeo híbrido no software <i>ANTIGENpro</i>	84

LISTA DE SIGLAS

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
Ana o 1	Alérgeno 1 de <i>Anacardium occidentale</i>
Ana o 2	Alérgeno 2 de <i>Anacardium occidentale</i>
Ana o 3	Alérgeno 3 de <i>Anacardium occidentale</i>
APC's	Células apresentadoras de antígenos
Arg	Arginina
Ara h 1	Alérgeno 1 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 2	Alérgeno 2 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 3	Alérgeno 3 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 5	Alérgeno 5 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 6	Alérgeno 6 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 7	Alérgeno 7 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 8	Alérgeno 8 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 9	Alérgeno 9 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 10	Alérgeno 10 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 11	Alérgeno 11 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 12	Alérgeno 12 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 13	Alérgeno 13 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 14	Alérgeno 14 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 15	Alérgeno 15 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 16	Alérgeno 16 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 17	Alérgeno 17 de <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 18	Alérgeno 18 de <i>Arachis hypogaea</i>
ASIT	Imunoterapia específica para alérgenos (do inglês, <i>Allergen-specific immunotherapy</i>)
Asp	Ácido Aspártico
BCR	Receptores de células B
Ber e 1	Alérgeno 1 de <i>Bertholletia excelsa</i>
Ber e 2	Alérgeno 2 de <i>Bertholletia excelsa</i>
Bet v 1.0201	Alérgeno 1.0201 de <i>Betula verrucosa</i>
CBA	<i>Cytometric Beads Array</i>
Cor a 1	Alérgeno 1 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 1.0401	Alérgeno 1.0401 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 2	Alérgeno 2 de <i>Corylus avellana</i>

Cor a 6	Alérgeno 6 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 8	Alérgeno 8 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 9	Alérgeno 9 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 10	Alérgeno 10 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 11	Alérgeno 11 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 12	Alérgeno 12 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 13	Alérgeno 13 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 14	Alérgeno 14 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 15	Alérgeno 15 de <i>Corylus avellana</i>
Cor a 16	Alérgeno 16 de <i>Corylus avellana</i>
Der f 3	Alérgeno 3 do <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p 1	Alérgeno 1 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DS	Desafiado
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
Fab	Fragmento de união ao antígeno (do inglês, <i>Fragment antigen-binding</i>)
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade
F1	Fração de massa molecular superior a 30.000 Dalton
F2	Fração com massa molecular entre 10.000 e 30.000 Dalton
F3	Fração de massa molecular menor que 10.000.
Glu	Ácido glutâmico
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HLA	Antígeno leucocitário humano
IEDB	Banco de dados de epítopos imunes (do inglês, <i>The Immune Epitope Database</i>)
IFN-γ	Interferon-gama
Igα	Imunoglobulina alfa
Igβ	Imunoglobulina beta
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G da subclasse 1

IgG4	Imunoglobulina G da subclasse 4
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-25	Interleucina 25
IL-33	Interleucina 33
IM	Imunizações
Ip	Intraperitoneal
I.U.I.S	União Internacional das Sociedades de Imunologia
Jug r 1	Alérgeno 1 de <i>Juglans regia</i>
Jug r 2	Alérgeno 2 de <i>Juglans regia</i>
Jug r 3	Alérgeno 3 de <i>Juglans regia</i>
Jug r 4	Alérgeno 4 de <i>Juglans regia</i>
Jug r 5	Alérgeno 5 de <i>Juglans regia</i>
Jug r 6	Alérgeno 6 de <i>Juglans regia</i>
Jug r 7	Alérgeno 7 de <i>Juglans regia</i>
Jug r 8	Alérgeno 8 de <i>Juglans regia</i>
kDa	Kilodaltons
Lys	Lisina
Mal d 1.0108	Alérgeno 1.0108 de <i>Malus domestica</i>
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior (do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>)
MTT	((3-(4,5-dimeThyl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide))
PA	Proteínas albuminas 2S de amendoim
PBS	Tampão fosfato-salino
PDB	Banco de dados de proteína (do inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
PG	Proteínas albuminas 2S de gergelim
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico teórico

Pis v 1	Alérgeno 1 de <i>Pistacia vera</i>
Pis v 2	Alérgeno 2 de <i>Pistacia vera</i>
Pis v 3	Alérgeno 3 de <i>Pistacia vera</i>
Pis v 4	Alérgeno 4 de <i>Pistacia vera</i>
Pis v 5	Alérgeno 5 de <i>Pistacia vera</i>
PIT	Imunoterapia baseada em peptídeos
Pp	Peptídeo híbrido de células T
PR – 10	Proteína relacionada à patogênese
QSAR	Relação da atividade de estrutura-atividade quantitativa
RBD	Região do domínio de ligação ao receptor
Ric c 1	Alérgeno 1 de <i>Ricinus communis</i>
Ric c 3	Alérgeno 3 de <i>Ricinus communis</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
Ses i 1	Alérgeno 1 de <i>Sesamun indicum</i>
Ses i 2	Alérgeno 2 de <i>Sesamun indicum</i>
Ses i 3	Alérgeno 3 de <i>Sesamun indicum</i>
Ses i 4	Alérgeno 4 de <i>Sesamun indicum</i>
Ses i 5	Alérgeno 5 de <i>Sesamun indicum</i>
Ses i 6	Alérgeno 6 de <i>Sesamun indicum</i>
Ses i 7	Alérgeno 7 de <i>Sesamun indicum</i>
SFB	Soro fetal bovino
SMV	Máquina de suporte de vetores
TCR	Receptores de células T
TFA	Ácido trifluoracético
Th1	Células T <i>helper</i> do tipo 1
Th2	Células T <i>helper</i> do tipo 2
Th3	Células T <i>helper</i> do tipo 3
Th17	Células T <i>helper</i> do tipo 17
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF-α	Fator de transformação de crescimento alfa
TNF-β	Fator de necrose tumoral beta
TR	Tratamentos
T _{REG}	Células T reguladoras

Sumário

RESUMO	12
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE SIGLAS.....	18
1. Introdução.....	23
2. Revisão bibliográfica.....	25
2.1. Importância das oleaginosas comestíveis na alimentação humana	25
2.2. Alergia desencadeada pelo consumo de oleaginosas	26
2.3. Reatividade cruzada entre alérgenos alimentares	31
2.4. Etiopatogênese das doenças alérgicas.....	32
2.5. Alergia molecular e medicina de precisão.....	36
2.6. Epítomos	37
2.6.1. Epítomos de células T	38
2.6.2. Epítomos de células B	40
2.7. Imunoterapias para o tratamento de doenças alérgicas.....	41
2.7.1. Imunoterapia alérgeno específica (ASIT).....	41
2.7.2. Imunoterapia baseada em peptídeos (PIT).....	43
2.7.3. Tratamento da alergia por bloqueio de IgE	45
2.8. Ferramentas de bioinformática e suas aplicações à imunologia	46
2.8.1. Ferramentas de identificação de epítomos de células B lineares e descontínuos..	47
2.8.1.1. IEDB - <i>Bepipred</i>	47
2.8.1.2. <i>BcePred</i>	48
2.8.1.3. <i>BCPREDS</i>	49
2.8.2. Ferramentas de identificação de epítomos de células T	49
2.8.2.1. NetMHCII	51
3. Objetivos.....	52
3.1. Objetivo Geral.....	52
3.2. Objetivos Específicos.....	52
4. Metodologia	53
4.1. ETAPA I – Análise <i>in silico</i>	53
4.1.1. Obtenção das sequências proteicas dos alérgenos	54
4.1.2. Predição de peptídeo sinal	54
4.1.3. Alinhamento múltiplo das sequências e construção da árvore filogenética	54

4.1.3.1. Visualização do alinhamento das sequências no software <i>Jalview</i>	55
4.1.4. Avaliação das propriedades físico-químicas	55
4.1.5. Predição da estrutura secundária dos alérgenos	55
4.1.6. Predição de epítomos de células B.....	55
4.1.7. Predição de epítomos de células T.....	55
4.1.8. Seleção de epítomos para síntese do peptídeo híbrido de células T	56
4.1.9. Avaliação das propriedades físico-químicas do peptídeo híbrido de células T ...	56
4.1.10. Predição e determinação da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T.....	57
4.1.11. Predição da antigenicidade do peptídeo híbrido de epítomos de células T.....	57
4.2. ETAPA II – Caracterização dos alérgenos	58
4.2.1. Extração, purificação e caracterização de albumina 2S das oleaginosas	58
4.2.2. Separação das frações proteicas por cromatografia líquida de exclusão molecular.....	58
4.2.3. Eletroforese SDS-PAGE	58
4.2.4. Análise <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	58
4.2.4.1. Animais e delineamento do ensaio de sensibilização.....	58
4.2.4.2. Avaliação sorológica por ensaio imunoenzimático de ELISA.....	59
4.2.4.3. Investigação dos epítomos de células T.....	60
4.2.4.3.1. Cultura de células e estimulação antigênica.....	61
4.2.4.3.2. Avaliação da proliferação dos esplenócitos.....	61
4.2.4.3.3. Avaliação da produção de citocinas das células do baço.....	62
4.2.4.3.4. Tratamento com o peptídeo híbrido de células T.....	62
4.2.4.3.5. Análise estatística.....	63
5. Resultados.....	63
5.1. ETAPA I - Análise <i>in silico</i>	63
5.1.1. Predição de peptídeo sinal	63
5.2. Alinhamento das sequências e construção da árvore filogenética	65
5.3. Avaliação das propriedades físico-químicas	69
5.4. Predição da estrutura secundária	71
5.5. Predição de epítomos de células B.....	72
5.6. Predição de epítomos de células T	76
5.7. Síntese do peptídeo híbrido de células T	81
5.8. Avaliação das propriedades físico-químicas do peptídeo híbrido de células T	82
5.9. Predição e determinação da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T.....	83
5.10. Predição da antigenicidade do peptídeo híbrido de epítomos de células T.....	84
5.11. ETAPA II - Caracterização dos alérgenos.....	85

5.12. Extração, purificação e caracterização de albumina 2S das oleaginosas	85
5.12.1. Separação das frações proteicas por cromatografia líquida de exclusão molecular	85
5.12.2. Eletroforese SDS-PAGE.....	87
5.12.3. Níveis séricos de imunoglobulinas de animais sensibilizados com alérgenos de gergelim e amendoim	87
5.13. Investigação dos epítopos de células T	89
5.13.1. Avaliação da proliferação dos esplenócitos	89
5.13.2. Avaliação da produção de citocinas das células do baço	90
5.14. Tratamento com o peptídeo híbrido de células T	93
6. Discussão	95
7. Conclusão.....	109
8. Referências	110
9. Apêndices.....	120

1. Introdução

A alergia alimentar é um problema de saúde pública que impacta na qualidade de vida de pacientes sensibilizados e alérgicos. Após o consumo ou a exposição acidental a alimentos alergênicos, inicia-se o desenvolvimento da alergia, com manifestações clínicas como a dor abdominal, diarreia, vômitos e anafilaxia (SOLÉ *et al.*, 2018).

A alergia alimentar atinge desde os bebês e estende-se a crianças e adultos, mas recentemente os dados indicam que as taxas são mais elevadas na população adulta (WARREN; JIANG; GUPTA, 2020). Pais de bebês apontaram que aproximadamente 23,5% de seus filhos apresentam alergia alimentar, mas esses dados foram superestimados, pois após avaliação médica e testes de provocação oral confirmou-se apenas 1,9% (VIEIRA *et al.*, 2020).

A prevalência da alergia alimentar na população em geral é estimada entre 2 e 10%, destacando-se as nozes, castanhas e amendoim as oleaginosas que mais causam alergias (OCHFELD; PONGRACIC, 2019). Essa prevalência varia entre as regiões. Na Europa, a alergia a avelã é predominante, pois ocorre com frequência a reação cruzada com pólen de bétula. No Reino Unido e Austrália a castanha-do-pará possui maior potencial alergênico, e nos Estados Unidos a amêndoa e a castanha do caju se destacaram mais (MCWILLIAM *et al.*, 2020).

No Brasil, pouco se sabe sobre a prevalência da alergia alimentar, pois os dados são escassos, e os estudos se limitam a grupos específicos de alérgenos, os registros de prevalência se baseiam no teste cutâneo, na quantificação de IgE específica ou na percepção de pacientes, o que implica na superestimação da prevalência, dificultando assim a análise dos dados reais (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Na região central do Brasil, a prevalência foi estimada com indivíduos adultos entre 18 a 65 anos, empregando um questionário europeu, a fim de reduzir possíveis erros. Foi observado que 10,8% dos indivíduos relataram ter alergia alimentar, e os alimentos mais apontados foram as frutas, leite, camarão e legumes. Destes indivíduos, apenas 1% foi considerado com diagnóstico médico de alergia alimentar (SILVA *et al.*, 2016). Em crianças com idade pré-escolar (4 a 59 meses) a prevalência foi de 0,61% (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Nos países industrializados as oleaginosas são muito consumidas, o que contribui com o aumento da alergia alimentar. Essas sementes são encontradas em diversos produtos comercializados, e a fim de evitar a deflagração da alergia, o paciente deve ter o cuidado ao selecionar o que será consumido e confiar no conteúdo descrito nos rótulos das embalagens (MENDES *et al.*, 2019).

Com aumento do número de casos da alergia alimentar despertou-se uma maior preocupação nos serviços de saúde, pois nos casos de reações anafiláticas graves e que pode levar o paciente a óbito, torna-se necessário a procura imediata por hospitais e serviços de emergências (MACDOUGALL; BURKS; KIM, 2021).

Alguns estudos sugerem que para bebês a introdução precoce dos potenciais alimentos alergênicos poderiam evitar a alergia alimentar mediada por IgE, mas isso deve ser realizado com cautela pois, não se estende a todos os tipos de alimentos e para toda a população de bebês (DEVONSHIRE; LIN, 2021).

Inicialmente, os cuidados requeridos para a alergia alimentar é evitar o consumo do alimento alergênico, e caso tenha iniciado o processo alérgico, recomenda-se para o tratamento das reações o uso de anti-histamínicos e da epinefrina (MACDOUGALL; BURKS; KIM, 2021). Entretanto, mesmo evitando certos tipos de alimentos, muitos pacientes alérgicos relatam ingerir acidentalmente algum tipo de alimento alergênico (COMMINS *et al.*, 2016).

Atualmente existem várias alternativas para minimizar os problemas desencadeados pelo consumo de alimentos alergênicos. No geral, o tratamento convencional para alergias consiste na utilização de fármacos que agem na redução temporária dos sintomas, como os anti-histamínicos, porém eles não têm o poder de cura da doença. Por outro lado, surge a imunoterapia que atua na dessensibilização, que pode ser administrada por diversas vias e ser utilizada nas doenças alérgicas (YU; FREELAND; NADEAU, 2016).

A imunoterapia específica para alérgenos (ASIT) consegue impedir a evolução dos sintomas dos pacientes alérgicos e seus efeitos são mantidos mesmo após a retirada do tratamento. Através da ASIT, torna-se possível alterar a resposta imune específica para o alérgeno e os efeitos do tratamento podem ser monitorados através do aumento dos níveis de IgG específicos (VALENTA; CAMPANA; NIEDERBERGER, 2017).

Apesar dos benefícios da imunoterapia, ela possui um agravante por utilizar extratos alergênicos naturais e conter diversos componentes além do alérgeno sensibilizante, os quais podem desencadear eventos colaterais graves. Desta forma, surge a necessidade de isolar, modificar ou substituir os alérgenos naturais, a fim de melhorar suas características, segurança e eficácia. Isso se torna possível através do desenvolvimento de novos métodos alternativos que utilizam ferramentas de biologia molecular e bioinformática, os quais contribuem com a identificação dos peptídeos candidatos para a imunoterapia (TABESH *et al.*, 2019).

O avanço em pesquisas tornou-se possível o desenvolvimento de fármacos biológicos para o tratamento das doenças alérgicas, que são mais específicos que os

tratamentos tradicionais, mas em contrapartida, implicam em custos elevados e requerem locais especializados e de pessoal qualificado para executar o tratamento (DANIELL; KULIS; HERZOG, 2019).

Assim, considerando os impactos na saúde pública gerados pela alergia alimentar e nas alternativas disponíveis para o tratamento, nossos estudos se concentram no isolamento, caracterização, identificação de epítomos de células B e T, visando buscar uma estratégia de tratamento para a alergia alimentar baseada numa imunoterapia com peptídeos de epítomos de células T.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Importância das oleaginosas comestíveis na alimentação humana

As oleaginosas são alimentos muito consumidos pela população. Dentre elas, destaca-se o amendoim (*Arachis hypogaea L.*), devido a sua facilidade de ser encontrado e de sua acessibilidade, o que o torna uma boa opção de consumo. O seu consumo ocorre na forma natural, ou através de produtos processados como óleos, manteigas, amendoins salgados, em produtos de confeitaria dentre outros (BONKU; YU, 2020).

Estudos descreveram que a ingestão do amendoim pode trazer benefícios à saúde humana, pois possui alto valor nutricional. Ele é capaz de oferecer energia devido sua composição, baseada em aproximadamente 50% de lipídios, 28% de proteínas e 15% de carboidratos. Todos os seus nutrientes são importantes, pois estão relacionados com a reserva lipídica e muscular, o crescimento e desenvolvimento corpóreo. O amendoim é fonte de minerais, vitaminas do complexo B e E, importantes no estímulo do sistema imune e na digestão alimentar, é fonte de fibras, que atuam na redução do nível de colesterol, nas doenças do coração e na manutenção do peso. O seu consumo também está relacionado na redução de doenças como o cálculo biliar, obesidade, hipertensão e câncer (BONKU; YU, 2020).

A castanha de caju (*Anacardium occidentale L.*) é uma oleaginosa de importante valor econômico sendo composta por proteínas, óleos de triglicerídeos e carboidratos, o que favorece seu consumo na forma de petisco, como também pode ser encontrada em farinhas e nos produtos processados. Entretanto, a castanha de caju contém proteínas alergênicas responsáveis por causar reações exacerbadas no nosso sistema imunológico (MENDES et al., 2019).

As castanhas de caju geralmente são consumidas após serem torradas e são usadas em diversas preparações. Essas sementes além de serem ricas em proteínas

vegetais, possuem muitos benefícios à saúde e já foram descritas no tratamento de doenças como diabetes, infecções de pele e inflamações (MENDES *et al.*, 2019).

Outros produtos industrializados e derivados das oleaginosas que podem ser encontrados no mercado são as bebidas baseadas em proteínas vegetais, obtidas a partir das nozes e amêndoas. Elas são consumidas em substituição ao leite de origem animal, já que possuem alto valor nutricional, ricas em cálcio, fósforo e potássio, além de possuírem sabor e textura agradáveis (QAMAR *et al.*, 2019).

A avelã (*Corylus avellana*) é amplamente consumida no mundo e sua produção dobrou nas últimas décadas. Cerca de 90% dessa castanha é consumida sem casca e encontrada em chocolates, biscoitos, cereais e produtos de confeitaria (BEYER *et al.*, 2002).

O gergelim (*Sesamum indicum*) é muito consumido na forma de sementes e normalmente é encontrado em vários produtos como produtos pães, hambúrgueres, biscoitos. A semente de gergelim é composta por aproximadamente 60% de óleo, que está presente em molhos para saladas e pode ser utilizado em preparações (PASTORELLO *et al.*, 2001a). Na região do Mediterrâneo é recomendado a crianças a ingestão de produtos que contém gergelim devido ao seu alto valor nutricional, já que esta semente contém proteínas ricas em metionina (WOLFF *et al.*, 2004).

As nozes (*Juglans regia* L.) também são comumente consumidas entre as pessoas, pois demonstra um hábito saudável. A sua inclusão na dieta está relacionada a uma redução nos níveis de colesterol, que conseqüentemente diminui riscos de desenvolver doenças cardíacas. As nozes também são muito utilizadas na área de confeitaria, podendo ser encontradas na forma de farinhas, pães, bolos dentre outros (LINACERO *et al.*, 2016).

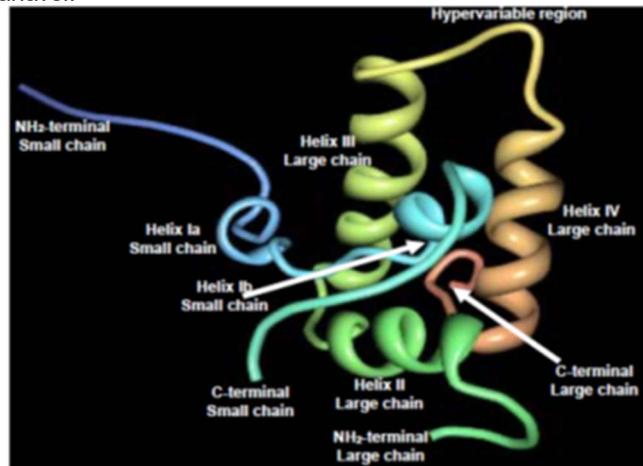
2.2. Alergia desencadeada pelo consumo de oleaginosas

Os principais alérgenos presentes em quase todas as sementes comestíveis pertencem à família das albuminas 2S (PASTORELLO *et al.*, 2001b). As albuminas 2S são proteínas de reserva pertencentes à superfamília das prolaminas (BREITENEDER; MILLS, 2005). O termo albumina 2S está relacionado com seu coeficiente de sedimentação (S_{20w}), sendo próximo de 2. Essas proteínas apresentam baixa massa molecular e são abundantes em sementes de várias espécies (YOULE; HUANG, ANTHONY, 1981).

As albuminas 2S apresentam um nível elevado de polimorfismo, gerando diversas isoformas que diferem entre si quanto à parte estrutural e suas características biológicas. Suas estruturas tridimensionais são compactas, consistem em um feixe de

5 hélices localizadas em regiões distintas e um loop C-terminal que se apresenta dobrado (figura 1). Pode-se observar uma região hipervariável mais exposta, considerada uma região passível de interação à IgE e desenvolver um processo alérgico (MORENO; CLEMENTE, 2008).

Figura 1: Estrutura terciária do alérgeno recombinante de mamona, Ric c 3. Na figura são demonstradas as 5 hélices e a região hipervariável.



Fonte: (MORENO; CLEMENTE, 2008).

Os alérgenos da família albumina 2S podem apresentar semelhanças estruturais entre si bem como com os de outras fontes, o que permite a ocorrência de reatividade cruzada, como por exemplo, o soro de paciente alérgico à mostarda, apresentou-se imunorreativo com albumina 2S de girassol. Também foi demonstrada a presença de reatividade cruzada entre albuminas 2S de gergelim com a papoula (MORENO; CLEMENTE, 2008).

Sabe-se que as proteínas pertencentes a família das albuminas 2S apresentam suas estruturas compactas, com um padrão conservado de resíduos de cisteínas, o que mantém sua estabilidade no trato gastrointestinal mesmo diante da ação pH ácido e de enzimas proteolíticas, e o fato de serem altamente estáveis contribuem com o seu poder alergênico (MORENO; CLEMENTE, 2008). Durante o processamento térmico dos alimentos, as albuminas 2S responsáveis pela sensibilização podem sofrer modificações nas suas estruturas, mas essas alterações não reduzem significativamente sua imunorreatividade (MENDES *et al.*, 2019).

As oleaginosas comumente comestíveis (amendoim, castanha do Brasil, pistache, avelã, noz, castanha de caju e gergelim) foram caracterizadas, organizadas em grupos e descritas conforme os parâmetros bioquímicos, homologia e massa molecular. A lista oficial do Subcomitê de Nomenclatura dos Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia (I.U.I.S.) está representada na tabela 1, destacando em negrito os alérgenos da classe das albuminas 2S.

Tabela 1 - Lista oficial dos alérgenos presentes nas oleaginosas. Neste levantamento sete sementes foram selecionadas (amendoim, castanha do Brasil, pistache, avelã, noz, castanha de caju e gergelim) e avaliadas de acordo com sua composição bioquímica e massa molecular (kDa), destacado em negrito os alérgenos pertencentes à classe das albuminas 2S, segundo o Subcomitê de Nomenclatura dos Alérgenos.

(Continua)

Fonte alimentar	Alérgeno	Identidade Bioquímica	Massa molecular (kDa)
Amendoim - <i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 1	Cupina (tipo Vicillina, globulina 7S)	64 kDa
	Ara h 2	Conglutina (albumina 2S)	17 kDa
	Ara h 3	Cupina (tipo leguminosa, globulina 11S, Glicinina)	60 kDa, 37 kDa (fragmento)
	Ara h 5	Profilina	15 kDa
	Ara h 6	Conglutina (albumina 2S)	15 kDa
	Ara h 7	Conglutina (albumina 2S)	15 kDa
	Ara h 8	Proteína relacionada à patogênese, PR-10, membro da família Bet v 1	17 kDa
	Ara h 9	Proteína de transferência de lipídios inespecífica do tipo 1	9.8 kDa
	Ara h 10	Oleosina	16 kDa
	Ara h 11	Oleosina	14 kDa
	Ara h 12	Defensina	8 kDa (reduzida), 12 kDa (não reduzida), 5,184 kDa (massa)
	Ara h 13	Defensina	8 kDa (reduzida), 11 kDa (não reduzida), 5,472 kDa (massa)
	Ara h 14	Oleosina	17.5 kDa
	Ara h 15	Oleosina	17.5 kDa
	Ara h 16	Proteína de transferência lipídica não específica tipo 2	8,5 kDa por SDS PAGE reduzindo
	Ara h 17	Proteína de transferência lipídica não específica tipo 2	11 kDa por SDS PAGE reduzindo
	Ara h 18	Ciclofilina - peptidil-prolil cis-trans isomerase	21 kDa
	Castanha do Brasil - <i>Bertholletia excelsa</i>	Ber e 1	Albumina 2S
Ber e 2		Globulina 11S	29 kDa
Pistache – <i>Pistacia vera</i>	Pis v 1	Albumina 2S	7 kDa
	Pis v 2	Globulina 11S	32 kDa
	Pis v 3	Vicilina	55 kDa
	Pis v 4	Manganês superóxido dismutase	25.7 kDa
	Pis v 5	Globulina 11S	36 kDa
Avelã – <i>Corylus avellana</i>	Cor a 1	Proteína relacionada à patogênese, PR - 10	17 kDa
	Cor a 2	Profilina	14 kDa
	Cor a 6	Homólogo da isoflavona redutase	35 kDa
	Cor a 8	Proteína de transferência de lipídios inespecífica do tipo 1	9 kDa
	Cor a 9	Globulina 11S	9 kDa
	Cor a 10	Proteína de ligação luminal	70 kDa
	Cor a 11	Globulina 7S	48 kDa
	Cor a 12	Oleosina	17 kDa
	Cor a 13	Oleosina	14 – 16 kDa
	Cor a 14	Albumina 2S	10 kDa
	Cor a 15	Oleosina	17 kDa
	Cor a 16	Globulina 7S contendo peptídeos de alfa-hairpinina N-terminal (vicilina_N)	6 – 8 kDa e 47.5 kDa

Tabela 1 - Lista oficial dos alérgenos presentes nas oleaginosas. Neste levantamento sete sementes foram selecionadas (amendoim, castanha do Brasil, pistache, avelã, noz, castanha de caju e gergelim) e avaliadas de acordo com sua composição bioquímica e massa molecular (kDa), destacado em negrito os alérgenos pertencentes à classe das albuminas 2S, segundo o Subcomitê de Nomenclatura dos Alérgenos.

(Conclusão)

Noz – <i>Juglans regia</i>	Jug r 1	Albumina 2S	15-16 kDa
	Jug r 2	Globulina 7S	44 kDa
	Jug r 3	Proteína de transferência de lipídios inespecífica do tipo 1	9 kDa
	Jug r 4	Globulina 11S	58.1 kDa
	Jug r 5	PR-10	20 kDa
	Jug r 6	Globulina 7S	47 kDa
	Jug r 7	Profilina	13 kDa
	Jug r 8	Proteína de transferência de lipídios inespecífica do tipo 2	9 kDa
Castanha de caju – <i>Anacardium occidentale</i>	Ana o 1	Proteína semelhante a vicilina	50 kDa
	Ana o 2	Proteína tipo leguminosa	55 kDa
	Ana o 3	Albumina 2S	14 kDa
Gergelim - <i>Sesamum indicum</i>	Ses i 1	Albumina 2S	9 kDa
	Ses i 2	Albumina 2S	7 kDa
	Ses i 3	Globulina 7S tipo vicilina	45 kDa
	Ses i 4	Oleosina	17 kDa
	Ses i 5	Oleosina	15 kDa
	Ses i 6	Globulina 11S	52 kDa
	Ses i 7	Globulina 11S	57 kDa

Fonte: Elaborado pela autora. Dados disponíveis em <http://www.allergen.org>. Acesso em 21/12/2022.

Pudemos observar que várias oleaginosas são capazes de desencadear reações alérgicas, porém, de acordo com “*Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (FALCPA)*”, que é a lei de rotulagem de alérgenos alimentares e proteção ao consumidor, foram identificados os oito alimentos como fontes dos principais alérgenos, chamados de “*The big 8 allergens*” sendo eles: amendoim, nozes, leite, ovos, peixes, crustáceos, trigo e soja. Em 2021, de acordo com o “*Food Allergy Safety, Treatment, Education, and Research (FASTER)*”, que é a Lei de segurança, tratamento, educação e pesquisa em alergia alimentar dos Estados Unidos, estes alimentos foram atualizados e “*The big 8 allergens*” passou a ser “*The big 9 allergens*” incluindo nesta lista o gergelim como o nono alérgeno alimentar (FDA, 2023).

Entre os alérgenos da família albumina 2S presentes nas oleaginosas, destacam-se Ana o 3 da castanha de caju (ROBOTHAM *et al.*, 2005), Ara h 2 e Ara h 6 do amendoim (FABER *et al.*, 2016), Ber e 1 da castanha do Brasil (PASTORELLO *et al.*, 1998), Jug r 1 da noz (TEUBER *et al.*, 1998) e Ses i 2 do gergelim (TEUBER *et al.*, 1998).

O amendoim é considerado o alimento que mais causa anafilaxia grave, e diante disso, a alergia ao amendoim requer o estado de alerta dos profissionais de saúde, do paciente e de sua família (DANIELL; KULIS; HERZOG, 2019). O paciente alérgico ao amendoim além de ser afetado com o desconforto dos sintomas da alergia, sofre

também com efeitos psicológicos e com os gastos financeiros que impactam no dia a dia (KIM; PATEL; BURKS, 2020).

O amendoim possui alérgenos muito resistentes, que mesmo após o tratamento a altas temperaturas, as condições ácidas e a ação das proteases no estômago, eles ainda permanecem estáveis mantendo suas características alergênicas. O amendoim contém alérgenos que pertencem às superfamílias das cupinas, vicilinas, prolaminas, dentre outras, mas os alérgenos das prolaminas, mais especificamente da família das albuminas 2S são os mais alergênicos e são denominados por Ara h 2, Ara h 6 e Ara h 7, sendo que o Ara h 2 apresenta prevalência de se ligar a IgE de 42 a 100% e o Ara h 6 de 86 a 92% (JOO CHAN; RICHARDO; LIM, 2019).

Embora alguns profissionais recomendam evitar o consumo de amendoim para impedir a deflagração da alergia, estudos sugerem que ao introduzir este alimento precocemente em crianças previamente selecionadas pode contribuir com a proteção contra a alergia, consistindo em uma forma de manejo da alergia alimentar (COMMINS *et al.*, 2016).

As avelãs são a causa comum de alergia alimentar em crianças e adultos, manifestando sintomas leves até a forma mais grave. Já foi descrito que essa oleaginosa possui alérgenos que são proteínas de reserva, sendo eles o Cor a 9 e Cor a 14, e o conhecimento mais profundo desses alérgenos contribui com o diagnóstico mais preciso da doença (NILSSON *et al.*, 2020).

Robotham *et al.* (2005) identificaram o alérgeno da castanha de caju Ana o 3 com massa molecular de aproximadamente 13 kDa classificado como membro da família albumina 2S. Nesse estudo verificou-se que o alérgeno reagiu com 81% de soros de pacientes.

O pistache (*Pistacia vera*) também é responsável por causar reações anafiláticas graves. A partir da semente do pistache foi isolado o principal alérgeno da família albumina 2S, denominado Pis v 1 com massa molecular de 7 kDa (AHN *et al.*, 2009).

Estudos com as nozes vem sendo realizado, pois essa oleaginosa possui proteínas alergênicas e a prevalência da alergia alimentar decorrente do seu consumo tem aumentado em diferentes regiões geográficas. Autores mostraram que a maioria dos pacientes alérgicos apresentaram uma dosagem de IgE específica elevada para o alérgeno Jug r 1, o alérgeno majoritário pertencente à família das albuminas 2S (ELIZUR *et al.*, 2020).

O gergelim é uma planta de origem indiana, mas comumente cultivada em diversos países e seu consumo expandiu para regiões da Europa e América do Norte, impactando no aumento de casos de reações alérgicas (WOLFF *et al.*, 2003). O

alérgeno majoritário do gergelim caracterizado é uma proteína albumina 2S com massa molecular de 9 kDa (PASTORELLO *et al.*, 2001a).

2.3. Reatividade cruzada entre alérgenos alimentares

A reatividade cruzada entre alérgenos é um fator importante para tratar as doenças alérgicas, para melhor gerenciá-las e avaliar a evolução do tratamento. Geralmente isso ocorre quando um paciente reage a outros alérgenos de forma inesperada por conterem as sequências de proteínas semelhantes, o que impacta negativamente no diagnóstico da doença (NUGRAHA; KAMATH; JOHNSTON, 2019).

Os níveis altos de similaridade e identidade contribuem com a reação cruzada entre alérgenos. Isso foi mostrado num estudo com o alérgeno do pistache, Pis v 1, onde seus peptídeos foram comparados com outras proteínas disponíveis nos bancos de dados evidenciando a homologia de três peptídeos do pistache com peptídeos presentes no alérgeno Ana o 3, da castanha de caju. Participaram deste estudo 28 pacientes alérgicos ao pistache, sendo que 82% desses pacientes apresentavam também alergia ao amendoim ou nozes, e 36% dos pacientes manifestaram sintomas alérgicos ao ingerirem a castanha de caju, concluindo que as similaridades estruturais favorecem a reatividade cruzada entre os alérgenos (AHN *et al.*, 2009).

O alérgeno da castanha de caju, Ana o 3, possui um epítipo linear com percentual alto de identidade de sua sequência com o alérgeno de noz, Jug r 1, o que favorece a ocorrência de reação cruzada, e também compartilha epítipos com os alérgenos de gergelim e mostarda (ROBOTHAM *et al.*, 2005).

A homologia entre os alérgenos alimentares foi mostrada também entre alérgenos do avelã com os alérgenos de amendoim e soja, com variação no percentual de homologia entre 45 e 50%, destacando um epítipo ligante de IgE presente no alérgeno de amendoim Ara h 3, que apresenta 67% de homologia com o do alérgeno Cor a 9 presente no avelã (BEYER *et al.*, 2002).

Uma pesquisa com pacientes alérgicos a noz-pecã mostrou que eles podem ser alérgicos também a noz, e essa co-sensibilização tem se tornado cada vez mais frequente. Nesta pesquisa evidenciou-se que de 61 pacientes que tinham alergia a noz, 49 deles apresentavam alergia a noz-pecã, e isso ocorre devido as semelhanças estruturais existentes entre elas (ELIZUR *et al.*, 2020). A co-sensibilização também pode ser vista num estudo envolvendo alérgenos da classe albumina 2S do amendoim. Neste estudo investigou-se a reatividade cruzada das isoformas Ara h 2, Ara h 6 e Ara h 7 em pacientes tolerantes e alérgicos ao amendoim. Verificou-se que todos os pacientes que

foram sensibilizados com as isoformas Ara h 2, 6 ou 7 foram co-sensibilizados a todas as três isoformas, que compartilham epítomos de reação cruzada (BLANKESTIJN *et al.*, 2018).

A reatividade cruzada pode ocorrer também entre alérgenos de origem alimentar com aeroalérgenos, como exemplo o pólen de bétula. Estudos mostraram que o alérgeno majoritário de pólen de bétula (Bet v 1) e o alérgeno Cor a 1 de avelã possuem níveis elevados de similaridades nas sequências proteicas, e a maioria dos pacientes alérgicos a avelã são alérgicos a pólen de bétula (PASTORELLO *et al.*, 2002).

Através das ferramentas de bioinformática tornou-se possível prever a reatividade cruzada entre alérgenos, o que permite fazer uma análise minuciosa dos seus epítomos, que são importantes na interação com os anticorpos, gerando dados que contribuem com o diagnóstico, prevenção e tratamento das doenças alérgicas (NUGRAHA; KAMATH; JOHNSTON, 2019).

2.4. Etiopatogênese das doenças alérgicas

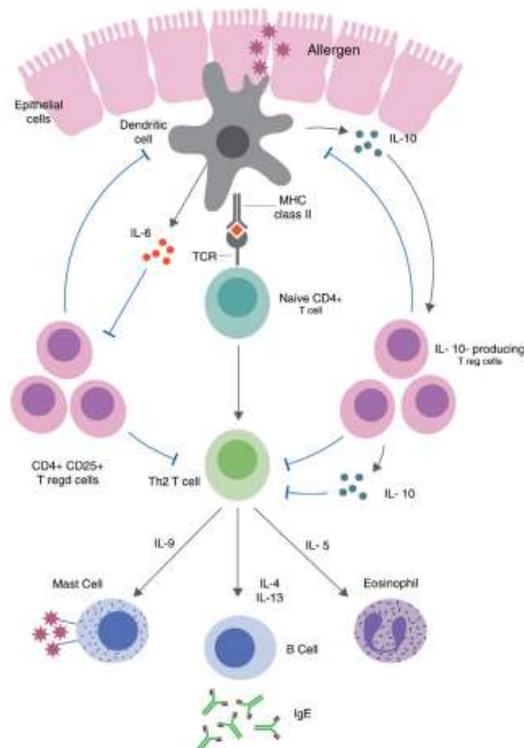
Quando um antígeno entra em contato com nosso organismo desenvolvemos as respostas imunes. Nesse processo, quando ocorre a produção de anticorpos específicos para um antígeno é chamado de resposta imune adaptativa, ou seja, obtida durante a vida, porém, acrescida de adaptações devido o contato com antígenos. Diferentemente, a resposta imune inata, que é nossa primeira linha de defesa, consiste numa resposta imediata contra diversos patógenos, porém, não é duradoura e específica (MURPHY *et al.*, 2010).

O processo de sensibilização ao alérgeno via alimentar ocorre no trato gastrointestinal, que evolui com as manifestações sistêmicas, ou pode ocorrer a reatividade cruzada com aeroalérgenos por apresentarem homologias nas suas estruturas primárias. Normalmente os sintomas manifestados na alergia alimentar se apresentam como prurido, inchaço, formigamento na boca, náusea, vômito, dor abdominal, sibilos, edema e urticária. Também pode ocorrer hipotensão, hipotermia e anafilaxia, que é a forma grave da reação alérgica (JOO CHAN; RICHARDO; LIM, 2019).

De um modo geral, as reações de hipersensibilidade mediada à IgE ocorrem em duas etapas, conhecidas como a sensibilização e a etapa efetora. Quando o indivíduo é exposto ao alérgeno alimentar, conforme mostrado na figura 2, este é capturado e internalizado pelas células apresentadoras de antígenos (APC's), sofre um processamento e é degradado em pequenos fragmentos que contêm os epítomos dos alérgenos. Esses fragmentos são apresentados pelas APC's através do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) da classe II para as células TCD4+, que se proliferam

e se diferenciam em células Th2, estimulando assim, as células B a produzirem as IgE's específicas do alérgeno, que se fixam na superfície dos mastócitos através dos receptores de IgE de alta afinidade (FcεRI) sensibilizando o paciente. Já a etapa efetora ocorre numa segunda exposição do paciente ao alérgeno, que se liga de maneira cruzada a IgE previamente fixada nos mastócitos, ativando-os a liberar os mediadores químicos presentes em seu interior (GUPTA *et al.*, 2016).

Figura 2 - Processo do desenvolvimento da alergia. Alterações na barreira epitelial favorecem a entrada de alérgenos desencadeando a ativação de células T e a produção de citocinas do perfil Th2.



Fonte: (NEDELKOPOULOU *et al.*, 2020).

O reconhecimento dos antígenos pelas células T e B são bastantes diferentes. Já foi descrito que as células T são capazes de fazer o reconhecimento de peptídeos localizados na parte interna das proteínas, que são chamados de epítomos de célula T e que se encontram ligados ao complexo de MHC, o que difere do reconhecimento dos epítomos de superfície das proteínas, que são reconhecidos pelas células B e chamados de epítomos de célula B (MURPHY *et al.*, 2010).

Os linfócitos TCD4+ se subdividem em conjuntos de células efetoras categorizados como T *helper* 1 (Th1), Th2, Th3, Th17 e células T reguladoras (T_{REG}), e isso se dá após o organismo ser estimulado por antígenos e dos tipos de citocinas que são produzidas (GAO *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2010).

O tipo de resposta Th1 produz as citocinas que estão envolvidas com a manutenção das respostas imunológicas, sendo elas: interleucina 2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral beta (TNF- β). Neste padrão de resposta, os macrófagos são ativados e atuam contra microrganismos patogênicos presentes no ambiente intracelular, envolvidos desta forma com a hipersensibilidade tardia. Já o tipo Th2 produz as citocinas: IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10. A IL-5 é uma citocina importante responsável pelo desenvolvimento dos sintomas da alergia que está envolvida no processo de ativação, produção e mobilização de eosinófilos para o foco de uma inflamação (MUKHERJEE; SEHMI; NAIR, 2014). As citocinas IL-4 e IL-10 atuam como supressoras dos macrófagos, bloqueando a sua estimulação e causando um desvio da resposta imunológica. A IL-4 também estimula os linfócitos B a produzirem as imunoglobulinas (FOSS, 1997).

Nedelkopoulou *et al.* (2020) descreveram que a IL-10 e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) agem como citocinas inibitórias e potencializam a ação das células Tregs de indução de uma resposta imune com tolerância ao determinado antígeno.

De acordo com Souza *et al.* (2010) o perfil de resposta Th2 atua contra patógenos de origem extracelular e está envolvido com a imunidade humoral, ou seja, é dependente da produção de anticorpos. Breiteneder *et al.* (2019) descreveram que o rompimento da barreira epitelial leva a exposição à proteínas, levando a ativação das citocinas conhecidas como pró-inflamatórias (TNF- α , IL-13, IL-25 e IL-33) que atuam na indução da inflamação e favorecem a resposta do tipo Th2. Pesquisadores mostraram também que as células Th2 são capazes de induzir a células Treg a suprimirem a ação e/ou ativação de células que participam do processo inflamatório (MEILER *et al.*, 2008).

Desta forma, torna-se evidente que são as citocinas relacionadas ao perfil Th1 ou Th2 é que irão direcionar o padrão de resposta, como também irão bloquear o padrão oposto, visto que, quando a resposta Th1 for ativada conseqüentemente a resposta Th2 será inibida (SOUZA *et al.*, 2010). Considerando as citocinas IL-12 e IL-4 como citocinas chaves para diferenciação no padrão Th1 e Th2, respectivamente.

Sendo assim, o nosso corpo na condição fisiológica normalmente apresenta a proporção das células Th1/Th2 em níveis ideais. Em contrapartida, nas alergias alimentares mediadas por IgE são produzidas mais citocinas do perfil Th2, destacando níveis elevados de IgE produzidas pelas células B. Isso também foi demonstrado em estudos, com o aumento de citocinas do perfil Th1 após o tratamento com imunoterapia baseada em peptídeos de células T (GAO *et al.*, 2020).

Os linfócitos Th17 participam da inflamação nos tecidos de forma precocemente, sendo responsáveis pela produção das citocinas pró-inflamatórias, as interleucinas IL-17, que agem contra bactérias extracelulares e fungos. Através da produção das citocinas pelas células Th17 é que as células do perfil Th1 serão ativadas e deslocadas para o local da inflamação (SOUZA *et al.*, 2010).

Meiler *et al.* (2008) mostraram que as células Treg não têm apenas a função de suprimirem respostas celulares do tipo Th1 ou Th2. As células Treg através da regulação de algumas subclasses de anticorpos são capazes de suprimirem inflamações alérgicas através do estímulo da produção da imunoglobulina G da subclasse 4 (IgG4), como também de inibir a produção de IgE. Outras formas das células Treg de controlar as doenças alérgicas, consistem na supressão das APC's, o que impacta na indução de células do perfil Th1 e Th2; supressão das células efetoras (Th1 e Th2) e dos mastócitos e basófilos.

Assim, o estado de homeostase do nosso sistema imune é resultante do equilíbrio entre as células Th1/Th2 e das células reguladoras de citocinas. Quando ocorrem alterações que resultem em exacerbações nas respostas das células Th17 e alterações nas respostas das células T reguladoras, o desenvolvimento de alergias pode ser impactado (WANG *et al.*, 2014).

Em relação aos níveis de anticorpos, alguns autores afirmam que normalmente indivíduos saudáveis apresentam níveis baixos de IgE específica. Já os indivíduos atópicos apresentam níveis aumentados de IgE, destacando-se também um aumento do número de receptores FcεRI, um dos principais componentes localizados na superfícies dos mastócitos e basófilos, responsável por iniciar o processo das reações alérgicas com a liberação dos mediadores químicos (RAVETCHE; KINET, 1991).

Outras subclasses de anticorpos envolvidas nas reações alérgicas vêm sendo estudadas por pesquisadores, destacando as subclasses da imunoglobulina G (IgG), mais precisamente IgG4. Pesquisadores afirmam que em indivíduos saudáveis ocorre uma variação nas respostas de células B, de modo que, pode não ocorrer a resposta ou a produção de IgG4 específica ou da imunoglobulina G da subclasse 1 (IgG1), e baixos níveis de IgE. Em contrapartida, indivíduos alérgicos apresentam níveis aumentados de IgE, porém, anticorpos IgG, e principalmente IgG4 também podem ser encontrados em níveis aumentados (AKDIS, 2006).

É descrito que a IgG4 age como um anticorpo bloqueador, capaz de competir com a interação do alérgeno à IgE, previamente fixado às células efetoras, evitando assim a ativação delas e a liberação de seus mediadores químicos. Assim, a IgG4 específica pode ser usada como biomarcador no tratamento com imunoterapias, visto

que níveis baixos é um indicador negativo, e a adesão inadequada ao tratamento pode impactar na indução de IgG4 (SHAMJI *et al.*, 2017).

2.5. Alergia molecular e medicina de precisão

Os alimentos contêm muitos nutrientes e dentre eles destaca-se as proteínas, capazes de induzir o sistema imune e desencadear o processo alergênico. Das proteínas, pequenas porções são capazes de estimular o organismo a produzir a IgE, tornando sua capacidade alergênica complexa. Diante da necessidade da compreensão desses alérgenos, gerou-se uma nova era dentro do mundo da alergia, chamada de “Alergia Molecular” (SOLÉ *et al.*, 2018).

Pesquisas estão sendo realizadas para obter uma melhor compreensão a nível molecular dos alérgenos alimentares e dos alimentos modificados geneticamente. Através do mapeamento dos epítomos e sua caracterização, torna-se possível compreender os aspectos relacionados à alergia desencadeada pelas proteínas (MORENO; CLEMENTE, 2008).

A caracterização dos alérgenos a nível molecular permite diagnosticar cada componente específico com uma melhor precisão e oferecer um tratamento mais adequado. Desta forma, torna-se possível desenvolver uma imunoterapia específica para o alérgeno, baseada em alérgenos recombinantes e peptídeos sintéticos, a fim de obter um tratamento personalizado, seguro e com melhor adesão (VALENTA; CAMPANA; NIEDERBERGER, 2017).

Com os avanços da alergia molecular podem surgir novos diagnósticos da doença e tratativas relacionadas aos riscos da sensibilização do paciente. A avaliação da sensibilização é realizada de forma individual, para que se tenha a nível molecular uma melhor identificação, de modo a substituir gradativamente o uso dos extratos alergênicos por produtos baseados em novas moléculas (MATRICARDI *et al.*, 2016).

O termo “Medicina de Precisão” é empregado na alergologia, que visa propor terapias personalizadas de acordo com o fenótipo da doença que o paciente apresenta (MATRICARDI *et al.*, 2016). Desta forma, pacientes com características clínicas semelhantes respondem aos tratamentos de maneiras diferentes, justificando que um único tratamento pode não se adequar a vários pacientes, sendo necessário assim um tratamento personalizado (COLLINS; VARMUS, 2015).

A medicina de precisão nas doenças alérgicas, pode ser definida como uma abordagem de tratamento que envolve o paciente na tomada de decisão da terapia a ser empregada. Nessa proposta de tratamento, deve ser considerado os fatores biológicos de cada paciente, a genética, o estilo de vida e o ambiente em que vive,

fatores estes que irão direcionar qual será o manejo ideal para aquele paciente contribuindo com o sucesso terapêutico (AGACHE; AKDIS, 2016).

Como na medicina de precisão é possível estabelecer os fenótipos das doenças alérgicas, é considerado também os aspectos que podem ser tratados através do tratamento personalizado, que consiste num tratamento mais econômico para o paciente. Isso contribui também com o aumento dos tipos de tratamentos direcionados, como exemplo a terapia baseada em produtos biológicos (EGUILUZ-GRACIA et al., 2018).

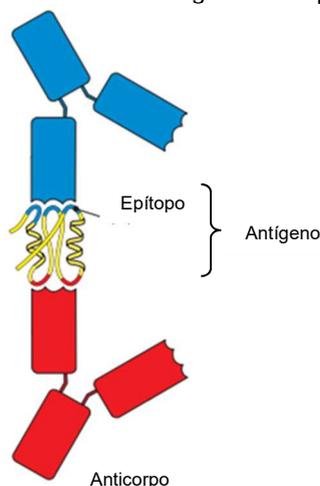
Após a implementação da medicina de precisão, deve ser avaliado a sua eficácia no dia a dia da área médica, através do uso de biomarcadores válidos, que são capazes de demonstrar de maneira precisa e quantificável todos os processos envolvidos nos fenótipos da doença (EGUILUZ-GRACIA et al., 2018; ÜZÜLMEZ; KALIC; BREITENEDER, 2020).

Assim, a alergia molecular está diretamente relacionada com a medicina de precisão, que buscam uma saúde com precisão, um tratamento individualizado para o paciente e métodos de prevenção da doença (MATRICARDI *et al.*, 2016).

2.6. Epítomos

No cenário imunológico, os epítomos são pequenas sequências presentes nos alérgenos capazes de gerar uma resposta imunológica (figura 3), ou seja, eles são os sítios de interação com os anticorpos e com os receptores das células (GUPTA *et al.*, 2016). Já o termo paratopo é utilizado para a região do anticorpo que reconhece o epítopo, ou seja, o local onde ocorre a interação anticorpo-antígeno (DALL *et al.*, 2014).

Figura 3 - Representação esquemática do epítopo. O antígeno está destacado em amarelo. A região do antígeno que se liga ao anticorpo é chamada de determinante antigênico ou epítopo.



Fonte: (MURPHY *et al.*, 2010).

De acordo com Rubinstein *et al.* (2008) os epítomos podem ser localizados em regiões convexas, mais especificamente em locais curvados ou nas superfícies do antígeno, o que os tornam muito acessíveis às regiões que formam o sítio de ligação ao antígeno-anticorpo. Eles podem ser encontrados como sequenciais, quando os resíduos de aminoácidos são dispostos de forma linear, ou seja, contínua, ou epítomos conformacionais, quando os resíduos dos aminoácidos são localizados em regiões distintas do alérgeno, ou seja, não contínua, mas que se agrupam no dobramento da sequência proteica (GUPTA *et al.*, 2016).

Os epítomos conformacionais podem ter suas estruturas comprometidas quando tratados com altas temperaturas, alta pressão e pela ação da radiação. Diferentemente, os epítomos sequenciais ao passarem por processos de fermentação com bactérias e hidrólise enzimática podem ser degradados em sequências menores, concluindo que esses fatores podem contribuir com a redução da alergenicidade (ZHOU *et al.*, 2021).

Estudos mostraram que os epítomos sequenciais que interagem com a IgE desempenham papel mais importante na deflagração da alergia do que os epítomos conformacionais, já que estes podem ser desestabilizados durante o processo de degradação enzimática (PEKAR; RET; UNTERSMAJR, 2018).

De acordo com Zhou *et al.* (2021), os epítomos que interagem com os anticorpos podem ser considerados como biomarcadores para avaliar casos recorrentes de alergia alimentar e a sua gravidade, de modo a auxiliar na tomada de decisão do tratamento. Desta forma, o mapeamento dos epítomos nos permite uma melhor compreensão das doenças alérgicas, contribuí para o desenvolvimento de tratamentos e de métodos de processamento dos alimentos que reduzem sua capacidade alergênica.

O avanço das pesquisas contribui com o mapeamento de epítomos, sendo possível determinar as estruturas dos complexos alérgeno-anticorpo. Para isso, são empregadas tecnologias como cristalografia de raios x, ressonância magnética e tecnologia recombinante. Atualmente novas tecnologias como o sequenciamento de anticorpos e hibridoma humano contribuirão para uma minuciosa compreensão das interações do alérgeno-IgE (POMÉS; MUELLER; CHRUSZCZ, 2020).

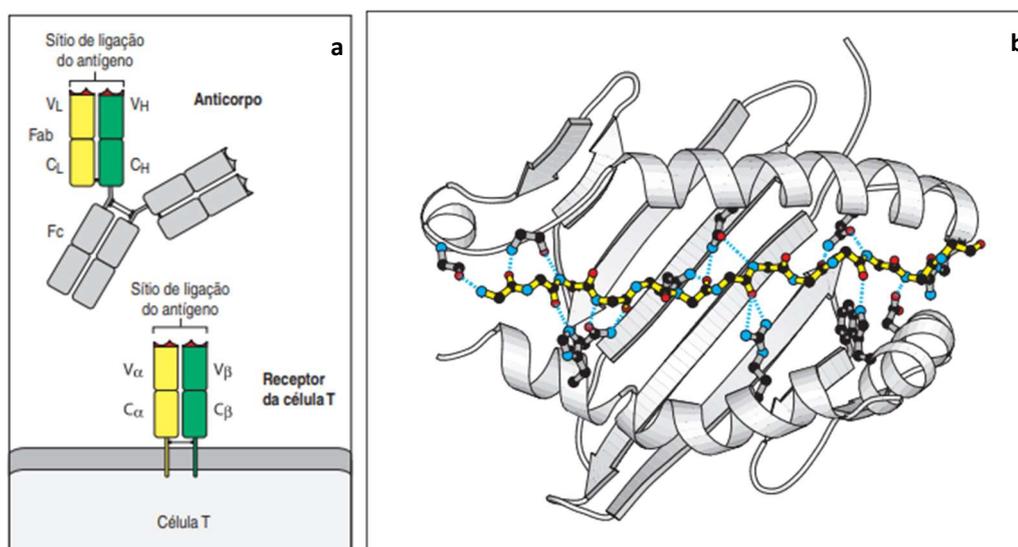
2.6.1. Epítomos de células T

Os epítomos de células T são pequenos fragmentos que ativam os linfócitos T, ou seja, são capazes de interagir com as moléculas do sistema antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês: *Human leukocyte antigen*) da classe II (MHC II), de modo que as células T se proliferam e liberam a citocina IL-2. Toda essa reação pode ser

visualizada após análise de predições nos estudos de proliferação de linfócitos (XU *et al.*, 2021).

Esses pequenos fragmentos peptídicos, normalmente compostos por 13 resíduos de aminoácidos, são reconhecidos pelos receptores de células T (TCR), que possuem estruturas variáveis, conforme ilustrado na figura 4 a. O TCR possui apenas um sítio de interação com o antígeno, e as suas semelhanças estruturais com o sítio de ligação do antígeno ao anticorpo, favorece o reconhecimento do peptídeo estranho quando ligado a uma molécula de MHC da classe II, que se dá através da interação por pontes de hidrogênio com o esqueleto do peptídeo (figura 4 b). Assim, o TCR atua como um ligante entre o MHC II e o peptídeo estranho (MURPHY *et al.*, 2010).

Figura 4 - O receptor de células T é um heterodímero semelhante ao fragmento Fab (do inglês, *fragment antigen-binding*, ou seja, fragmento de união ao antígeno) do anticorpo. Em **a**, demonstra que o receptor de células T é um heterodímero ligado por pontes dissulfeto, que apresenta 2 cadeias transmembrana α e β e possui uma porção semelhante ao domínio constante e outra porção semelhante ao domínio variável presente no anticorpo, para que desta forma o fragmento Fab do anticorpo se encaixe no sítio de reconhecimento do antígeno. Em **b**, destaca-se a ligação do peptídeo (esqueleto amarelo) a molécula de MHC II que ocorre através de pontes de hidrogênio (azul) que se formam com o esqueleto do peptídeo.



Fonte: (MURPHY *et al.*, 2010).

Os epítomos de células T são sequências, ficam localizados na superfície das células. Quando eles se encontram na parte mais interna dos alérgenos, ao sofrerem processos de desnaturação facilita a exposição do epítopo para que os anticorpos possam fazer o reconhecimento (ZHOU *et al.*, 2021).

De acordo com Dall *et al.* (2014), outras características dos epítomos de células T é que, além de suas sequências serem bem curtas, elas podem ser dispostas em

qualquer parte da sequência proteica do alérgeno, podendo estar localizada também na dobra tridimensional.

Pesquisas apontam que os epítomos de células T são capazes de induzir a tolerância imunológica através da indução das células T reguladoras que fazem a supressão das células Th2, diminuindo assim a produção de IgE. Essas condições favorecem a utilização dos epítomos de células T na imunoterapia oral, e isso foi demonstrado num estudo de desenvolvimento de uma imunoterapia baseada em peptídeos de células T do ovomucóide, um alérgeno da clara de ovo. Neste estudo verificou-se baixos níveis de IgE e de liberação de histamina, sendo alterado o perfil de resposta para Th1 (RUPA; MINE, 2012).

2.6.2. Epítomos de células B

Um epítomo de célula B constitui a parte de um alérgeno capaz de interagir com o anticorpo. Alguns autores descrevem que esses epítomos de células B são identificados como pequenas porções do alérgeno com características químicas distintas, que são expostas favorecendo a interação com as imunoglobulinas (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017). Já foi descrito que os epítomos de células B são encontrados na superfície dos alérgenos (DALL *et al.*, 2014).

O reconhecimento dos epítomos de células B é feito pelas imunoglobulinas que se encontram fixadas à membrana das células B, que atuam como receptores de células B (BCR). São as imunoglobulinas M (IgM) e D (IgD) fixadas a membrana que exercem o papel de receptores de antígenos nas células B virgens, chamadas de células pré-B, que juntamente com as imunoglobulinas alfa (Ig α) e beta (Ig β) formam o complexo de receptores de células B, que transduzem os sinais a partir do reconhecimento do antígeno (MURPHY *et al.*, 2010). A interação do antígeno aos receptores de células B induz as células B a se proliferarem, dando a origem a dois tipos de células B: as células efetoras ou plasmáticas. Essas duas células estimulam a produção de anticorpos e de células B de memória, que em casos de uma nova exposição ao antígeno são capazes de se proliferarem de forma rápida (EL-MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2008).

Logo, identificar os epítomos de células B, compreender suas características estruturais consiste num passo relevante para o desenvolvimento de novas terapias e diagnósticos (EL-MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2008). Alguns autores descreveram que, normalmente os epítomos de células B são conformacionais e não são apresentados pelas APC's, pois são reconhecidos diretamente pelos receptores de células B localizados na superfície das células B. Desta forma, os epítomos

conformacionais ao sofrerem desnaturação, suas estruturas tridimensionais são alteradas, afetando assim a interação com o anticorpo (ZHOU *et al.*, 2021).

Por outro lado, a maior parte dos programas de predição de epítomos de células B disponíveis são para identificar os epítomos lineares ou contínuos. Essa limitação está relacionada com as informações limitadas de estruturas terciárias e quaternárias depositadas nos bancos de dados, que são necessárias para a predição de epítomos conformacionais. Ainda assim, as pesquisas que buscam novos antígenos para vacinas a partir de epítomos lineares têm mostrado bons resultados (EL-MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2008; QUIJADA *et al.*, 1996).

2.7. Imunoterapias para o tratamento de doenças alérgicas

A imunoterapia é uma estratégia utilizada no tratamento da alergia alimentar que tem como objetivo induzir a tolerância do nosso sistema imunológico, para que em momentos de exposição ao alérgeno não ocorra o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (JOO CHAN; RICHARDO; LIM, 2019).

Nos últimos anos houve um aumento nas pesquisas de imunoterapia para o tratamento da alergia e os resultados têm mostrado efeitos positivos na dessensibilização. Os estudos buscam a padronização das doses para que se tenha uma boa eficácia com o mínimo de efeitos colaterais, para uma proteção em casos de exposição acidental e também uma melhor adesão do paciente ao tratamento (KIM; PATEL; BURKS, 2020).

2.7.1. Imunoterapia alérgeno específica (ASIT)

A imunoterapia alérgeno específica é um tratamento muito estudado para tratar doenças alérgicas que pode ser administrada por diversas vias, como subcutânea, sublingual, oral dentre outras (YU; FREELAND; NADEAU, 2016). Ela visa induzir a tolerância do sistema imune, contribuindo assim com a prevenção e o tratamento de alergias (PEREIRA; AUN; MELLO, 2017). Por ser um tratamento usado como dessensibilizador, ela é considerada um potente método com ação curativa de alergias, onde o sistema imune é exposto a pequenas doses do alérgeno de maneira contínua e diária, com o aumento da dose gradativamente até obter a dose alvo de manutenção (KULIS *et al.*, 2018).

Alguns autores relataram que no tratamento com a ASIT, inicialmente ocorre um aumento de IgE específica do alérgeno considerado transitório, pois com a aderência

ao tratamento prolongado, os níveis destes anticorpos reduzem induzindo a tolerância imunológica a longo prazo (SCADDING *et al.*, 2017). No geral, a ASIT se baseia na alteração da resposta do perfil Th2 para Th1. Com isso, ocorrerá a produção IFN- γ , que consequentemente estimulará a produção de IgG pelas células B ao invés da IgE, e/ou indução das células T reguladoras, que produzem citocinas como IL-10 e TGF- β (CASALE; STOKES, 2011). Com a presença da IL-10 ocorrerá a produção de IgG4, que inibirá a apresentação do antígeno às células do perfil Th2, os mastócitos não serão ativados, reduzindo assim o processo alérgico (JOO CHAN; RICHARDO; LIM, 2019; LARSEN; BROGE; JACOBI, 2016).

Quanto ao mecanismo de ação da ASIT, já foi descrito que a IgG4 tem papel importantíssimo, pois a IgG4 aumentada com o tratamento da ASIT ou decorrente da exposição a doses elevadas é capaz de interagir com o alérgeno evitando a interação da IgE previamente ligada aos mastócitos e basófilos, impedindo assim a ativação dessas células. Foi descrito também que a IgG4 alérgeno-específica compete com os mesmos epítomos da IgE, o que gera um estado de competição entre os dois isotipos de anticorpos e uma ação de bloqueio da IgE, ou seja, ela é induzida e interage com o alérgeno antes da IgE, o que impede a ativação das células efetoras (GŁOBIŃSKA *et al.*, 2018; MEILER *et al.*, 2008).

Para avaliar a eficácia e o sucesso da ASIT é empregado a dosagem dos níveis de IgE, IgG e IgG4, visto que os níveis de IgG1 e IgG4 irão se apresentar elevados. Também são avaliados os scores dos sintomas apresentados pelo paciente e a percepção da melhora da sua qualidade de vida (GEHLHAR *et al.*, 1999; SHAMJI *et al.*, 2017).

Estudos realizados para avaliar a longo prazo o tratamento com a ASIT mostraram que os níveis de IgE tendem a diminuir com o passar do tempo. Já em relação as subclasses IgG, após o tratamento com ASIT houve um aumento nos níveis de IgG1, e mais especificamente de IgG4. Foi observado também que após a retirada do tratamento os níveis de IgG4 foram aumentados, seguido de uma queda de aproximadamente 90% (SHAMJI *et al.*, 2017).

Vale ressaltar, que os extratos alergênicos utilizados na ASIT devem ser obtidos por laboratórios com condições adequadas para a sua produção. Porém, além dos alérgenos necessários na imunoterapia, os extratos podem conter outros alérgenos (JENSEN-JAROLIM; JENSEN; CANONICA, 2017). Deste modo, a não qualidade dos extratos pode comprometer a eficácia da imunoterapia e o paciente pode vir a apresentar efeitos colaterais (VALENTA; CAMPANA; NIEDERBERGER, 2017).

Mesmo sendo a única terapia com ação modificadora das doenças alérgicas, a imunoterapia no geral ainda é pouco utilizada, e várias questões precisam ser

melhoradas para que se tenha uma melhor adesão ao tratamento, ter ação de cura da doença a longo prazo, menos efeitos colaterais e novas terapias preventivas, lembrando que imunoterapia deve manter nas mesmas proporções as características de alergenicidade e imunogenicidade (BREITENEDER *et al.*, 2019).

2.7.2. Imunoterapia baseada em peptídeos (PIT)

A imunoterapia baseada em peptídeos (PIT) é uma estratégia inovadora no tratamento de alergias que apresenta eficácia e segurança, já que é composta por pequenos peptídeos, destacando-se neles a presença de epítopos ligantes de células T CD4+ que não ativam as células efectoras e não desencadeiam o processo alérgico (WAI *et al.*, 2016). A finalidade da PIT é induzir a tolerância aos alérgenos, a capacidade de estimular o sistema imune e de suprimir respostas inflamatórias desencadeadas pelos alérgenos. A PIT deve manter a característica imunogênica, pois, deve induzir a produção de IgG específico para o alérgeno, e estes anticorpos conseqüentemente poderão agir como bloqueadores da interação da IgE com o alérgeno, garantindo assim a proteção do paciente (LOZANO-OJALVO; LÓPEZ-FANDIÑO, 2017; VALENTA; CAMPANA; NIEDERBERGER, 2017).

Estudos apontam que a imunoterapia com o extrato bruto de amendoim pode causar reações graves por conter moléculas inteiras dos alérgenos. Desta forma, pesquisadores da Austrália desenvolveram uma imunoterapia baseada em peptídeos denominada PVX108, composta por pequenos peptídeos derivados de alérgenos do amendoim. Com o tratamento verificou-se que não houve a ativação de basófilos e os pacientes não apresentaram eventos adversos graves (PRICKETT *et al.*, 2019).

Hofer *et al.* (2017) pesquisaram um tratamento para alergia a pólen e a alergia alimentar. A fim de alterar as características alergênicas, foi realizado a combinação dos alérgenos Bet v 1.0201 do pólen, Mal d 1.0108 da maçã e Cor a 1.0401 do avelã, e obtiveram uma proteína híbrida com mutação na sequência proteica, conforme figura 5. Como resultado, a proteína híbrida não se ligou à IgE dos soros de pacientes alérgicos e a capacidade de ativar células T permaneceram bloqueadas.

Figura 5 - Sequências dos alérgenos (pólen, Bet v 1.0201, maçã, Mal d 1.0108 e avelã, Cor a 1.0401). Destaca-se as sequências que compõe a proteína híbrida, destacando a mutação no alérgeno de pólen.

MGVYTFENEFTSEIPPSRLFKAFLVDADNLIPIKIAP	Mal d 1.0108
QAIKQAEILEGNNGPGTIKKINFPEGFPFKYVKDRV	Bet v 1.0201
DEV DHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVAT	Cor a 1.0401
P SGSTIKS S ISNKYHTKGNASINEEEIKAGKEKAAGL	Mutação
FKAVEAYLLAHPDAYS	

Fonte: (HOFER *et al.*, 2017).

Diversos estudos que utilizam epítomos para fins imunoterápicos se baseiam na junção de epítomos de células B e/ou de células T dos alérgenos. Estas terapias são vantajosas e a combinação dos epítomos é importante para obtenção de novos tratamentos. Isso foi demonstrado em uma vacina para asma alérgica, que continha 3 epítomos de células T e 5 epítomos de células B derivados do Der f 3, alérgeno majoritário do ácaro (ZHAN *et al.*, 2015).

Pesquisadores observaram que peptídeos que contêm epítomos do alérgeno Der p 1 presente no ácaro da poeira doméstica, são capazes de induzir a tolerância oral ao alérgeno. Neste estudo, foi observado que a sensibilização de camundongos com peptídeos sintéticos apontou epítomos importantes que sensibilizam as células T (HOYNE *et al.*, 1994).

Thakur e Shankar (2016), através de análises de bioinformática mapearam os epítomos dos alérgenos de *Aspergillus fumigatus* e selecionaram peptídeos capazes de induzir respostas imunológicas de células B e T. Foi mostrado que 5 alérgenos possuíam uma região que continham epítomos de células B e T, sendo possível assim desenvolver uma imunoterapia com esses alérgenos.

Na imunoterapia baseada em epítomos de células B, deve-se mapear todos os sítios de interação do alérgeno com a IgE, para posteriormente serem projetados os fragmentos hipoalergênicos recombinantes que terão diminuída a capacidade de interação à IgE. Com isso, ocorrerá uma baixa ativação dos mastócitos, o que contribui para obtenção de um produto mais seguro para o paciente (VALENTA; CAMPANA; NIEDERBERGER, 2017).

Groot *et al.* (2020) descreveram a importância dos estudos dos epítomos de células T no desenvolvimento de vacinas, destacando o papel dessas células na segurança e eficácia. Sabemos que a memória das células T tem um papel importantíssimo quanto a proteção das vacinas.

Os epítomos de células T presentes nos peptídeos possuem afinidade por várias moléculas do complexo MHC II. Desta forma, durante a seleção dos peptídeos que irão compor uma imunoterapia deve-se ter muita atenção para que se consiga ter uma cobertura de toda a população de acordo com as características de ligação dos peptídeos com o MHC II (LARCHE, 2007).

Assim, para o desenvolvimento de uma vacina são utilizados os agentes adjuvantes juntamente com os epítomos de células T, que devem ser imunogênicos, ou seja, capazes de provocar uma resposta imunológica no organismo, e quanto mais epítomos de células T e de ligantes de HLA maior será a capacidade da vacina de estimular uma resposta imunológica (GROOT *et al.*, 2020).

A imunoterapia que contém epítopos de células T específicos dos alérgenos emprega peptídeos sintéticos curtos, normalmente com cerca de 20 resíduos de aminoácidos (EL-QUTOB *et al.*, 2015). Já foi descrito que peptídeos curtos são menos alergênicos que um alérgeno inteiro, pois, por não possuírem uma estrutura terciária, o seu poder de ligação cruzada com a IgE é reduzido, e conseqüentemente, a ativação dos mastócitos e basófilos também são afetadas (LARCHE, 2007).

Um estudo foi realizado com o alérgeno tropomiosina do camarão, já que este alérgeno é altamente reativo. Foram sintetizados peptídeos da tropomiosina, identificados os epítopos de células T, produzida uma proteína recombinante da tropomiosina e avaliada quais as sequências capazes de deflagrar a alergia em camundongos. Foi demonstrado que a imunoterapia amenizou as respostas alérgicas e proporcionou um equilíbrio nas respostas Th1/Th2, induzindo a produção de anticorpos IgG bloqueadores específicos contra a tropomiosina (WAI *et al.*, 2016).

Desta forma, a imunoterapia baseada em peptídeos surgiu com o intuito de reduzir a alergenicidade das imunoterapias, porém a imunogenicidade dos alérgenos deve ser mantida para que ocorra a indução da tolerância imunológica, estimulando assim as células do perfil Th1 e as células reguladoras (EL-QUTOB *et al.*, 2015).

2.7.3. Tratamento da alergia por bloqueio de IgE

Todas as informações geradas sobre os alérgenos influenciam na melhor compreensão das doenças alérgicas, contribuindo com a descoberta de novas tendências de diagnósticos e tratamentos (JENSEN-JAROLIM; JENSEN; CANONICA, 2017). Deste modo, é de suma importância o conhecimento dos epítopos dos alérgenos, pois, favorece o desenvolvimento de imunoterápicos para as alergias (MORENO; CLEMENTE, 2008; WOLFF *et al.*, 2004).

Estudos realizados por Robotham *et al.* (2002) com a noz inglesa demonstraram que o epítipo (QGL**RGEEMEEMV**) do alérgeno Jug r 1 era responsável pela interação com a IgE. Alterações nessa sequência foram realizadas, e a cada 12 resíduos de aminoácidos foi trocado pela alanina, a fim de avaliar a intensidade dessa interação. Foi constatado que o ácido glutâmico localizado na posição 42 possuía papel importante na ligação com a IgE.

Deus-de-Oliveira *et al.* (2011) trabalhando com as isoformas de albumina 2S de mamona, Ric c 1 e Ric c 3, demonstraram a presença de pelo menos 2 resíduos de ácido glutâmico e/ou ácido aspártico nas sequências dos epítopos e sua importância na ligação com a IgE. Neste estudo, os mastócitos foram sensibilizados com a IgE e incubados com o ácido glutâmico livre, na hipótese da região variável da IgE ser

bloqueada pelo ácido glutâmico. Concluiu-se que, após a incubação com os alérgenos da mamona, não houve a desgranulação dos mastócitos, pois, os sítios de ligação da IgE já estavam bloqueados.

Nesse sentido, outro estudo com alérgenos de mamona propôs um tratamento alternativo para o bloqueio de IgE utilizando o ácido L-glutâmico ou ácido glutâmico modificado. Foi demonstrado neste trabalho que o ácido L-glutâmico e ácido L-nitrobenzoil glutâmico apresentaram melhor atividade de bloqueio dos alérgenos de mamona com a IgE (DE CAMPOS MESQUITA *et al.*, 2023).

2.8. Ferramentas de bioinformática e suas aplicações à imunologia

O processo de design de novos tratamentos para as doenças alérgicas requer primeiramente o mapeamento de epítomos, o que nos permite uma análise prévia do alérgeno em questão. Para isso, são empregadas as ferramentas computacionais que são imprescindíveis no desenvolvimento de vacinas, pois, contribuem com os estudos *in silico* tornando possível prever a resposta imunológica (GROOT *et al.*, 2020).

As ferramentas de bioinformática e a inteligência artificial colaboram com a compreensão dos dados gerados pelos softwares, para que posteriormente essas informações possam ser utilizadas nos diagnósticos de doenças, desenvolvimento de terapias e monitoramento do curso das doenças alérgicas (BREITENEDER *et al.*, 2019).

Com o passar dos anos, pesquisadores e empresas dedicaram seus esforços para desenvolver ferramentas de imunoinformática que pudessem ser empregadas no desenvolvimento de novas vacinas, com o objetivo de investigar toda a participação dos epítomos de células T bem como suas “brechas” envolvidas no processo de ativação do sistema imune. Tudo isso somou-se positivamente com as pesquisas, pois novos algoritmos para a investigação de epítomos e desenvolvimento vacinas que se baseiam em peptídeos tornaram-se mais acessíveis (GROOT *et al.*, 2020).

Desta forma, as ferramentas de bioinformática são peças fundamentais no âmbito de pesquisas, pois, nos permite um melhor direcionamento nos dados gerados, para posteriormente serem selecionados os fragmentos proteicos de interesse no desenvolvimento de terapias, contribuindo com o tratamento de doenças alérgicas, além da redução de custos e tempo de análises.

O objetivo desse item não é gerar uma discussão, mas sim, apresentar quais os métodos selecionados para atingir os objetivos deste trabalho, em que uma parte combina ferramentas de imunoinformática para a busca de epítomos presentes nas oleaginosas comestíveis, com intuito preliminar para a composição de um protótipo de

uma terapia para alergia alimentar. Descrevemos abaixo as principais ferramentas de bioinformática utilizadas neste estudo *in silico*.

2.8.1. Ferramentas de identificação de epítomos de células B lineares e descontínuos

Estudos têm mostrado que a identificação de epítomos lineares vem apresentando resultados satisfatórios em pesquisas que buscam a identificação de novos antígenos vacinais e de alérgenos (VAN REGENMORTEL, 2006). O desenvolvimento de vacinas é um campo promissor que vem sendo estudado por muitos grupos de pesquisas. Neste sentido, esta pesquisa visou utilizar diferentes combinações de abordagens que envolvem as ferramentas de bioinformática que contribuíssem com a investigação de peptídeos candidatos a uma imunoterapia. Para isto, nossa primeira questão foi identificar quais as principais ferramentas que pudessem nos auxiliar no mapeamento dos epítomos imunogênicos.

2.8.1.1. IEDB - *Bepipred*

O IEDB (*Immune Epitope Data Base*) é considerado atualmente o maior banco de dados disponível de forma online, de fácil consulta no servidor da web, que contém peptídeos de células B imunogênicos. Além da predição de células B, o IEDB mantém integrado outras ferramentas de predições que contribuem com as pesquisas (SUN *et al.*, 2013).

Várias abordagens para prever epítomos foram desenvolvidas a partir da característica linear dos epítomos de células B, e isso foi possível através do conhecimento das estruturas das proteínas. Percebeu-se com os estudos que a predição de epítomos de células B era mais complexa do que para os epítomos de células T, pois, foi visto uma complexidade maior na interação do epítomo de célula B com o anticorpo, quando comparado com o epítomo de célula T, que durante o reconhecimento no complexo MHC ele é degradado em peptídeos (DALL *et al.*, 2014).

No processo de predição de epítomos de células B, são utilizadas escalas que tem o objetivo de avaliar a tendência das características físico-químicas dos resíduos de aminoácidos e a tendência média ao longo da sequência proteica do antígeno, que normalmente ocorre com seis resíduos de aminoácidos. Então, é de acordo com os máximos das escalas de tendência visualizadas é que são determinadas as posições dos possíveis epítomos, gerando assim a predição dos epítomos (DALL *et al.*, 2014).

O método *BepiPred* que prevê epítomos de células B lineares originou-se da combinação do método oculto de Markov com o método de escala de propensão. O método oculto de Markov avalia se a posição central da janela foi anotada como um pedaço do epítomo, já o método escala de propensão determina para cada aminoácido um valor de propensão de acordo com suas características físico-químicas (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006).

Posteriormente surgiu o *Bepipred 2.0*, que utiliza algoritmo e é treinado somente para epítomos com estruturas conhecidas, o que fornece resultados com bom desempenho e melhor qualidade quando comparado com a versão anterior. A sua utilização é relativamente simples e rápida, onde o usuário deve inserir no programa a sequência da proteína no formato fasta, e em poucos minutos os resultados são apresentados, destacando os epítomos na sequência informada (JESPERSEN *et al.*, 2017).

De posse dos epítomos preditos, o usuário pode realizar seus experimentos de interação alérgeno-anticorpo para visualizar melhor os sítios de interação, confirmar os epítomos preditos e avaliar os métodos empregados na predição (DALL *et al.*, 2014).

2.8.1.2. *BcePred*

A ferramenta *BcePred* é utilizada inicialmente para projetar vacinas baseadas em peptídeos, capaz de fazer a predição de epítomos contínuos de células B presentes nas sequências proteicas, levando em conta as características físico-químicas dos resíduos de aminoácidos. O software é de fácil utilização, sendo possível combinar as propriedades físico-químicas dos aminoácidos como a flexibilidade, polaridade, hidrofobicidade e superfície exposta, podendo o usuário utilizar qualquer uma delas ou de forma combinada, e por fim submeter os dados (SAHA; RAGHAVA, 2004).

As propriedades físico-químicas dos epítomos são quantificadas de modo que, todos os resíduos de aminoácidos recebem um determinado valor (SAHA; RAGHAVA, 2007).

Como resultado, o programa gera um gráfico destacando os resíduos de aminoácidos, com os scores e cada característica físico-química numa cor específica, permitindo a visualização do epítomo. A precisão dos epítomos lineares de células B gerados pelo programa consegue atingir a 58,70% quando as propriedades hidrofobicidade, flexibilidade, polaridade e superfície exposta são combinadas, mas a sensibilidade foi descrita de 56% e a especificidade de 61% (SAHA; RAGHAVA, 2004).

2.8.1.3. *BCPREDS*

O *BCPREDS* é um software online de predição de epítomos de células B o qual permite ao usuário selecionar o método adequado para seu estudo e prever epítomos de células B. O software é de simples utilização, sendo necessário informar a sequência da proteína, o que permite inserir o tamanho do epítomo que se deseja, bem como o limite de especificidade, visto que essas duas informações não são obrigatórias. Este programa utiliza métodos de aprendizagem de máquina que se baseia em máquina de suporte de vetores (SMV), capaz de prever epítomos de células B lineares a partir da sequência proteica do antígeno que variam de 12 a 30 resíduos de aminoácidos (EL-MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2008).

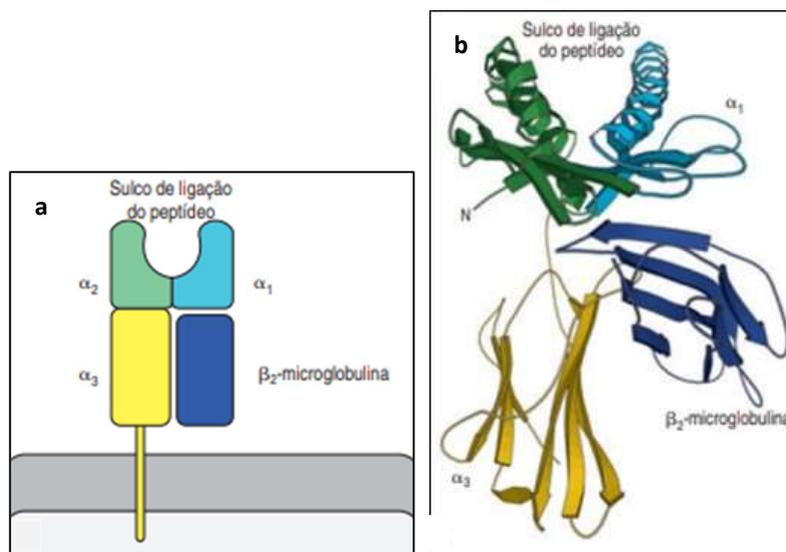
2.8.2. Ferramentas de identificação de epítomos de células T

Para iniciar o estudo de design de vacinas que se baseiam em epítomos de células T são empregadas as análises *in silico* dos epítomos de células T, onde as sequências proteicas dos antígenos podem ser obtidas no banco de dados Uniprot no formato FASTA para análises posteriores nos programas computacionais. A partir daí, busca-se identificar os melhores ligantes de HLA da classe I (ou MHC-I) ou HLA da classe II (ou MHC-II) (GROOT *et al.*, 2020).

Para a identificação dos melhores ligantes do HLA torna-se necessário compreender o complexo MHC, que participa da codificação dos genes de HLA considerados os mais polimórficos do nosso genoma e que executam papel importante na apresentação dos peptídeos antigênicos aos linfócitos T (GOLDBERG; RIZZO, 2015).

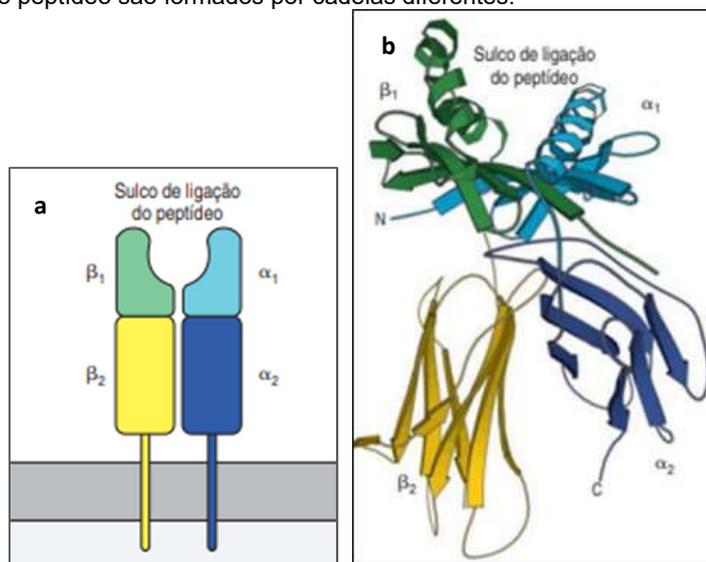
O complexo de MHC se divide em 2 classes: na classe I (figura 6) e II (figura 7). A classe I participa da codificação das moléculas HLA-A, HLA-B e HLA-C, cuja função consiste na apresentação dos peptídeos aos linfócitos T citotóxicos (CD8). Já a classe II codifica as moléculas HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM e HLA-DO que são expressos nas superfícies das APC's e responsáveis pela apresentação dos peptídeos aos linfócitos TCD4+ (GOLDBERG; RIZZO, 2015).

Figura 6 - Molécula do MHC I. Composta por 1 cadeia transmembrana de glicoproteínas α que juntas constituem 3 domínios (α_1 , α_2 e α_3), associada de forma não-covalente a cadeia β_2 -microglobulina que não atravessa a membrana, constituindo o 4º domínio, como mostrado em **a**. Em **b**, nos mostra o diagrama em fitas da molécula.



Fonte: (MURPHY *et al.*, 2010).

Figura 7 - Molécula do MHC II. Composta por 2 cadeias transmembrana de glicoproteínas α e β , onde cada cadeia possui 2 domínios e as 2 cadeias formam uma estrutura compacta de 4 domínios, como mostrado no quadro **a**. O quadro **b** nos mostra o diagrama do MHC II em fitas, destacando os domínios que formam o sulco de ligação com o peptídeo são formados por cadeias diferentes.



Fonte: (MURPHY *et al.*, 2010).

Podemos observar nas figuras 6 e 7, que as estruturas das moléculas MHC I e II são muito semelhantes, porém, algumas diferenças são apresentadas, como por exemplo o MHC II, que possui o sítio de ligação com o peptídeo composto por 2 domínios de cadeias diferentes (α e β), enquanto no MHC I é formado apenas pelo domínio de cadeia α (MURPHY *et al.*, 2010).

O objetivo de prever os epítomos de células T é rastrear no antígeno quais peptídeos curtos que conseguem estimular as células T, e essa habilidade de estimular as células T se define em imunogenicidade, que pode ser confirmado em laboratórios através de ensaios com peptídeos sintéticos. Assim, as análises *in silico* de predição de epítomos de células T se baseia na interação do peptídeo à molécula de MHC II (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017).

Estudos mostraram que os peptídeos que se ligam ao MHC II podem ter o comprimento de 9 a 22 resíduos de aminoácidos, porém, existe um núcleo de ligação entre o MHC II e o peptídeo que compreende 9 resíduos, sendo esta pequena sequência que encaixa no sulco de ligação da molécula MHC II, e que normalmente é predita pelos programas de predição de epítomos (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017).

Existem alguns fatores que impactam na predição de epítomos de células T, bem como na escolha dos epítomos que irão fazer parte do design de uma futura vacina, sendo eles: o alto grau de polimorfismo do MHC II e os seus diferentes tipos de alelos; a vasta quantidade de peptídeos; a força de interação do peptídeo ao MHC; além do elevado número de dados gerados após a análise do sistema (DESAI; KULKARNI-KALE, 2014).

Atualmente, existem muitos métodos utilizados para a predição de epítomos de células T, que subdividem em métodos de predição direta, o qual analisa de acordo com a sequência apresentada e a estrutura dos epítomos, levando em conta as características anfipáticas, ou seja, a molécula apresenta regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, a presença de motivos dentre outras. Já os métodos indiretos, realizam a predição da interação do peptídeo ao MHC empregando técnicas que se baseiam em análises estatísticas, como as redes neurais artificiais, matrizes quantitativas, SVM, simulações do encaixe molecular da proteína, relação da atividade de estrutura-atividade quantitativa (QSAR) dentre outras (DESAI; KULKARNI-KALE, 2014).

2.8.2.1. NetMHCII

Sabemos que o complexo MHC II possui papel importante no nosso sistema imune, pois, ao apresentar os antígenos às células T, ele é capaz de estimular a imunidade humoral e celular. Deste modo, diversos pesquisadores têm buscado desenvolver ferramentas que auxiliam na compreensão de quais peptídeos que se ligam a esse complexo (NIELSEN; LUND OLE, 2009).

O NetMHCII é um programa de predição de epítomos de células T que se fundamenta na afinidade de ligação do peptídeo à molécula de MHC. Ele é considerado um dos melhores métodos de predição de epítomos que utiliza algoritmos baseados em redes neurais artificiais para a predição dos epítomos que são extraídos do IEDB (JENSEN *et al.*, 2018).

Compreende-se por rede neural artificial, um método capaz de simular os circuitos dos neurônios não biológicos, ou seja, o ensino aos computadores a processarem os dados como o nosso cérebro, de modo a reconhecer padrões complexos, para que depois ele seja capaz de reconhecer padrões semelhantes a estes à medida que for apresentando novos dados (DESAI; KULKARNI-KALE, 2014).

De acordo com Jensen *et al.* (2018), a imunogenicidade está relacionada à força de ligação dos peptídeos à molécula de MHC II, e isto contribui com os estudos de identificação de epítomos de células T para o desenvolvimento de novos tratamentos e diagnósticos de doenças.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o uso de um peptídeo sintético derivado de epítomos de células T dos alérgenos da classe albuminas 2S das oleaginosas comestíveis como uma nova estratégia para o tratamento de alergias alimentares.

3.2. Objetivos Específicos

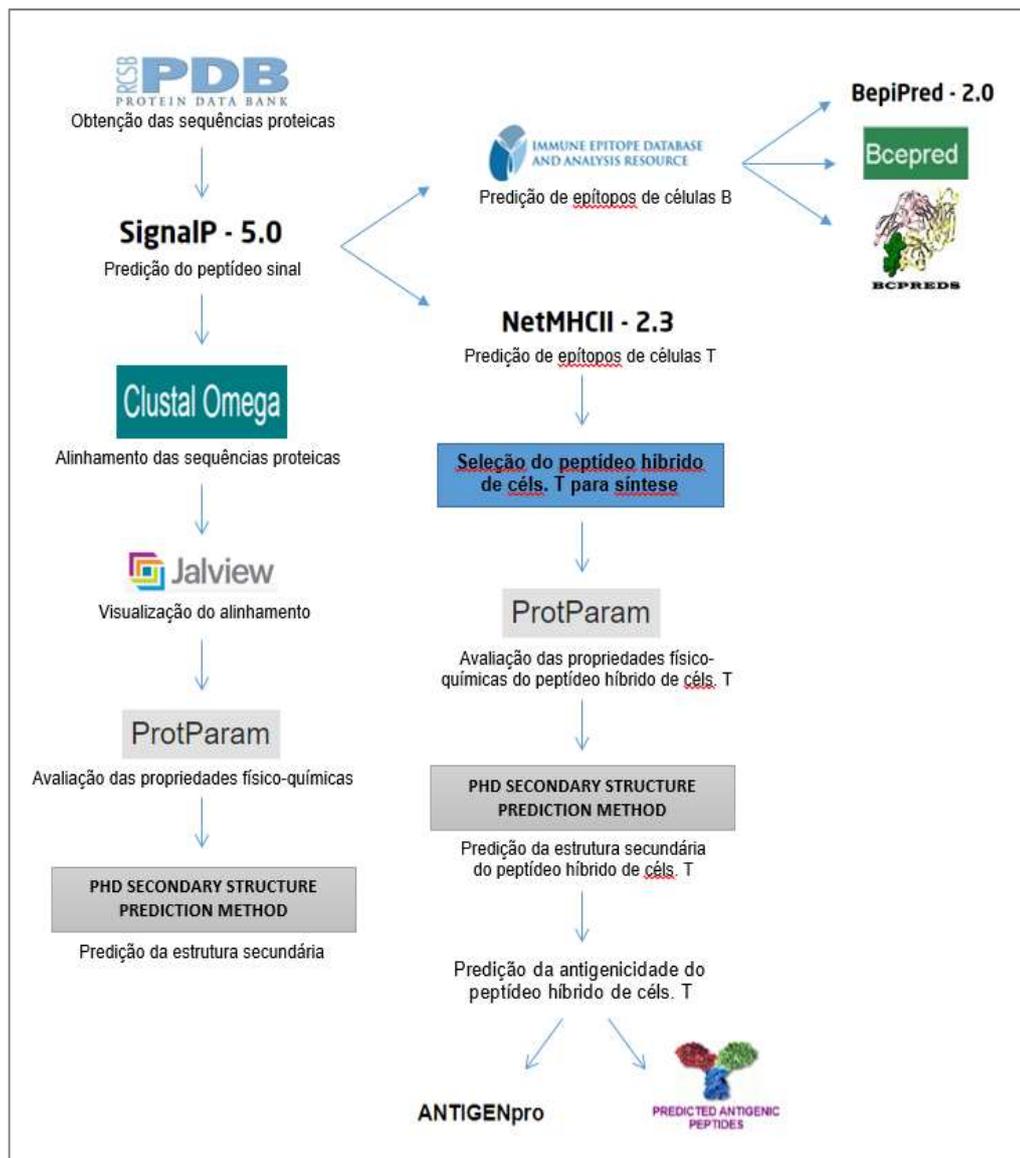
- Realização de estudos *in silico* através de ferramentas de bioinformática para identificação de epítomos de células B e T das oleaginosas que pertencem à classe de albuminas 2S (amendoim, castanha do Brasil, pistache, avelã, noz, castanha de caju e gergelim).
- Síntese de um peptídeo híbrido de células T a partir de epítomos presentes nos alérgenos das oleaginosas pertencentes à classe de albuminas 2S.
- Ensaio *in vitro* com o peptídeo híbrido de células T.
- Avaliação da resposta imunológica desencadeada pelo tratamento com o peptídeo híbrido de células T em camundongos Balb/c.
- Validação dos estudos *in silico* empregando o peptídeo híbrido de células T em estudos de proliferação celular e de citocinas.

4. Metodologia

4.1. ETAPA I – Análise *in silico*

Neste item será discutida a metodologia empregada na realização deste trabalho. A figura 8 apresenta um esquema simplificado do estudo *in silico* realizado neste trabalho.

Figura 8 - Esquema representativo da metodologia do estudo *in silico* simplificada.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1. Obtenção das sequências proteicas dos alérgenos

Para iniciar as análises *in silico*, foi necessário obter as sequências proteicas dos alérgenos da classe das albuminas 2S presentes nas oleaginosas através do banco de dados de estruturas proteicas denominado PDB – Banco de Dados de Proteína (do inglês, *Protein Data Bank*), (disponível no endereço <https://www.rcsb.org/>) e salvas no formato *fasta*.

4.1.2. Predição de peptídeo sinal

A predição do peptídeo sinal nos indica o local de clivagem para que a sequência correspondente ao peptídeo sinal seja retirada para prosseguir com as análises seguintes. A existência de peptídeo sinal das sequências proteicas dos alérgenos foi avaliada com o uso do software *SignalP* 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). As sequências proteicas dos alérgenos que não apresentaram peptídeo sinal também foram mantidas para as análises posteriores.

O software *SignalP* 5.0 utiliza um método de rede neural profunda, porém, é combinado com campo aleatório condicional e aprendizado de transferência, o que contribui com uma previsão de peptídeo sinal confiável e com melhor desempenho (ARMENTEROS *et al.*, 2019).

4.1.3. Alinhamento múltiplo das sequências e construção da árvore filogenética

Os alinhamentos múltiplos das sequências proteicas são importantes para que seja possível o processamento dos dados biológicos, bem como estimar a árvore filogenética. A partir das sequências proteicas identificadas, torna-se possível compará-las, alinhá-las e obter a construção da árvore filogenética através do Clustal Ômega 1.2.4, disponível no servidor EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Para submeter um *job* no Clustal Ômega, foi necessário definir os parâmetros que são obrigatórios, como o formato, que foi definido “ClustalW” e a inserção das sequências proteicas sem o peptídeo sinal no formato *fasta*, que é um dos formatos recomendado. Após a definição dos parâmetros, é possível submeter o *job*, que então nos apresenta os alinhamentos múltiplos e a árvore filogenética relacionadas as sequências em questão.

4.1.3.1. Visualização do alinhamento das sequências no software *Jalview*

De posse do resultado do alinhamento múltiplo no Clustal Ômega, foi obtida a URL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-l20220303-170110-0196-7394389-p1m/aln-clustal>) para ser visualizada no programa *Jalview*.

4.1.4. Avaliação das propriedades físico-químicas

As propriedades físico-químicas dos alérgenos foram avaliadas pelo programa *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Os parâmetros analisados dos alérgenos incluíram composição de aminoácidos, massa molecular, ponto isoelétrico teórico (pI), número total de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu), número total de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys), índice alifático e índice de instabilidade.

4.1.5. Predição da estrutura secundária dos alérgenos

A predição da estrutura secundária dos alérgenos foi realizada pelo software PHD disponível em (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>). Este software é de fácil utilização online, que utiliza para as predições redes neurais e apresenta resultados bem precisos quando comparados com a espectroscopia de dicroísmo circular.

4.1.6. Predição de epítomos de células B

A existência de epítomos reconhecidos por células B foi investigada. Os epítomos foram determinados enviando as sequências dos alérgenos aos softwares de predição de epítomos imunes IEBD *Analyses Resource* através do método *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* (<http://tools.iedb.org/bcell/>) (JESPERSEN *et al.*, 2017), *BcePred* (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) (SAHA; RAGHAVA, 2004) e *BCPreds* (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/>) (EL-MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2008), para posterior comparação e análise.

4.1.7. Predição de epítomos de células T

As análises computacionais são comumente empregadas no meio científico, pois, através dos dados gerados, como por exemplo, na predição de epítomos de células

T, ocorre uma redução importante no número dos possíveis ligantes ao MHC que seriam testados em bancada. Neste trabalho os epítomos de células T foram determinados enviando as sequências dos alérgenos ao software de predição de epítomos NetMHC II 2.3 (JENSEN *et al.*, 2018), disponível em (<http://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3>). Este software avalia a afinidade de ligação dos epítomos quando são expostas as moléculas de HLA da classe II, o MHC II.

O NetMHC II é um método de predição que utiliza rede neural artificial capaz de identificar de forma simultânea o núcleo de ligação e afinidade de ligação aos alelos de MHC II. Ele é responsável pela predição de epítomos de células T compostos por 13 a 18 resíduos e a afinidade de interação foi calculada para alelos HLA-DR, do MHC de classe II.

Nesse tipo de predição foram executados uma variedade de algoritmos, a fim de gerar uma combinação de resultados que fossem capazes de prever a qualidade de peptídeos que apresentassem características antigênicas ao sistema imunológico. De acordo com Brito (2014) foi parametrizado 14 alelos de humanos de HLA-DR, sendo eles: HLA-DRB1-0101, HLA-DRB1-0301, HLA-DRB1-0401, HLADRB1-0404, HLA-DRB1-0405, HLA-DRB1-0701, HLA-DRB1-0802, HLA-DRB1-0901, HLA-DRB1- 1101, HLA-DRB1-1302, HLA-DRB1-1501, HLA-DRB3-0101, HLA-DRB4-0101, HLA-DRB5-0101. Os melhores candidatos foram selecionados de acordo com a média de afinidade com HLA.

4.1.8. Seleção de epítomos para síntese do peptídeo híbrido de células T

Após uma análise minuciosa dos epítomos de células T preditos computacionalmente pelo método NetMHCII, o próximo passo foi definir um peptídeo híbrido baseado nas sequências proteicas das oleaginosas comestíveis para ser sintetizado. O peptídeo híbrido foi sintetizado comercialmente pelo fabricante GenScript.

4.1.9. Avaliação das propriedades físico-químicas do peptídeo híbrido de células T

As propriedades físico-químicas do peptídeo híbrido de células T foram avaliadas pelo programa *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Os parâmetros analisados incluíram composição de aminoácidos, massa molecular, ponto isoelétrico teórico (pI), número total de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu), número

total de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys), índice alifático e índice de instabilidade.

4.1.10. Predição e determinação da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T

Após a identificação do peptídeo híbrido de células T (IRQAVRQQMVQQISPSQGCQF), a sua estrutura secundária foi predita usando o software PHD disponível em (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) através do método SIMPA96.

A estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T foi determinada pela espectrometria de dicroísmo circular, em espectropolarímetro modelo J-815 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan), de acordo com as instruções do fabricante. O peptídeo foi dissolvido em água destilada, colocado em cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm de comprimento à 20 °C. O espectro obtido foi uma média de seis varreduras consecutivas, adquiridas a uma velocidade de varredura de 100 nm/min, largura de banda de 1 nm e resposta de 1 s.

4.1.11. Predição da antigenicidade do peptídeo híbrido de epítomos de células T

A predição da antigenicidade é uma etapa importante para ser realizada antes da síntese de peptídeos, pois ela busca reconhecer se o peptídeo possui a capacidade de estimular uma resposta imunológica protetora. Para verificar o potencial antigênico do peptídeo híbrido, utilizamos primeiramente o software *ANTIGENpro*, disponível em <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>. Este software através de *microarray* nos permite medir a antigenicidade através de análises da sequência com limiar de 0,5 (MAGNAN *et al.*, 2010).

Em seguida, avaliamos a antigenicidade pelo software *Predicted Antigenic Peptides*, disponível em (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>). Este software é capaz de prever dentro da sequência do peptídeo analisada quais segmentos estão mais envolvidos na indução de resposta imunológica, fornecendo como resultado fragmentos com tamanho mínimo de 8 resíduos com uma precisão de 75%.

4.2. ETAPA II – Caracterização dos alérgenos

4.2.1. Extração, purificação e caracterização de albumina 2S das oleaginosas

Após a análise de todo o estudo teórico realizado *in silico*, definimos então 2 tipos de oleaginosas que são comumente consumidas para seguir com as próximas análises experimentais, sendo elas: o gergelim e amendoim.

A extração, purificação e caracterização de alérgenos pertencentes à classe de albuminas 2S presentes nestas oleaginosas foram realizadas conforme descrito por Hummel *et al.*, (2015). As sementes foram maceradas e desengorduradas com hexano. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recolhido foi seco em capela de exaustão. As proteínas foram extraídas com tampão citrato de sódio, centrifugadas e o sobrenadante rico em proteínas foi utilizado para obter as frações proteicas conforme subitem abaixo.

4.2.2. Separação das frações proteicas por cromatografia líquida de exclusão molecular

Os extratos proteicos foram submetidos à cromatografia líquida de exclusão molecular, empregando a resina Sephadex G-50 para a separação das frações como proposto por (MACIEL *et al.*, 2009). Inicialmente, foi empregada a fase móvel ácido trifluoracético (TFA) 0,1% e as proteínas foram detectadas por absorvância a 220 e 280 nm. As frações de interesse foram secas no liofilizador.

4.2.3. Eletroforese SDS-PAGE

Após a obtenção das frações proteicas foi realizada a análise de homogeneidade por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%), segundo (LAEMMLI, 1970).

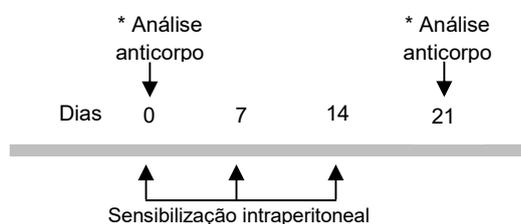
4.2.4. Análise *in vitro* e *in vivo*

4.2.4.1. Animais e delineamento do ensaio de sensibilização

Este ensaio foi realizado de acordo com Mine e Yang (2009) com adaptações, em colaboração com a Dr^a Giliane da Silva de Souza, do Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-UENF), protocolo nº 297. Todos os camundongos utilizados nos

ensaios deste trabalho foram fêmeas de 6 a 8 semanas da linhagem BALB/c e obtidos na unidade de criação de animais da UENF. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos (n=5/grupo) e imunizados de acordo com Deus-de-Oliveira *et al.* (2011) com modificações. O grupo 1 (controle negativo) recebeu 100 μ L de tampão fosfato-salino (PBS); grupos 2 e 3 receberam 50 μ g de albumina 2S de amendoim e 50 μ g de albumina 2S de gergelim respectivamente na presença de 4 mg de hidróxido de alumínio/inoculação, administrados por via intraperitoneal (ip) nos dias 0, 7 e 14. Amostras de sangue do seio retro-orbital foram coletadas nos dias 0 (pré-imune) e 21 para avaliação sorológica de anticorpos IgE, IgG e IgG1 séricos conforme item 4.2.4.2. O cronograma da sensibilização pode ser visualizado na figura 9.

Figura 9 - Cronograma esquemático da sensibilização de camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.4.2. Avaliação sorológica por ensaio imunoenzimático de ELISA

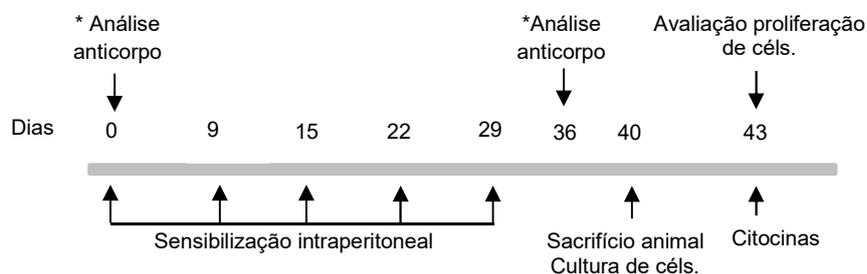
O ensaio ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) foi realizado de acordo com Deus-de-Oliveira *et al.* (2011) com modificações; e utilizado para a detecção de anticorpos séricos específicos para as subclasses IgG, IgG1 e IgE. Utilizando placas de 96 poços de poliestireno (*Nunc-Immuno Plate I F*), os poços foram sensibilizados com 60 μ L/poço de albuminas 2S de amendoim e gergelim (0,33 μ g/ μ L) diluídas em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 50 mM, pH 9,6 a 4°C durante a noite (18 h). Após a lavagem com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), os poços foram bloqueados com PBS-T contendo 1% de gelatina durante 1 h a temperatura ambiente, e então lavados com PBS-T e incubados com as amostras de soros (1:5 para IgE e 1:100 para IgG1 e IgG) diluídas em tampão bloqueador a 37°C por 1 h. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS-T e tratados com anticorpos secundários (*SouthernBiotech*) anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgE conjugados a peroxidase, diluídos (1:500, 1:500, 1:2000 respectivamente) em PBS-T contendo gelatina 1% e mantidos por 1 h a 37°C. Após novas etapas de lavagem foi iniciada a revelação do ensaio. Foi adicionada uma solução reveladora, contendo 10 mg de OPD, 10 μ L de peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂), 6,5

mL de ácido cítrico 0,1 M, 7,0 mL de fosfato de sódio monobásico 0,2 M e 11,5 mL de água (H₂O) destilada, por 10 min na ausência de luz. A reação foi interrompida adicionando-se 60 µL de ácido sulfúrico 3N (H₂SO₄) por poço. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (*Thermo Plate Reader*).

4.2.4.3. Investigação dos epítomos de células T

A investigação dos epítomos de células T foi realizada de acordo com a proliferação das células, conforme Mine e Yang (2009) com adaptações, e em colaboração com a Dr^a Rebeka da Conceição Souza e Dr Fabrício Moreira Almeida do Laboratório de Biologia do Reconhecer da UENF. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n = 6/grupo), onde o grupo 1 (controle) recebeu 200 µL de PBS, e os grupos 2 e 3 receberam respectivamente 40 µg de albumina 2S de gergelim e amendoim, emulsionados em 100 µL de adjuvante. As amostras foram administradas (200 µL/inoculação) via intraperitoneal (ip) nos dias 0, 9, 15, 22 e 29, totalizando cinco imunizações, sendo que, nos dias 0 e 9 foi utilizado 100 µL de adjuvante completo de Freund; nos dias 15 e 22 foi utilizado 50 µL de adjuvante incompleto de Freund, e no dia 29 foi administrado somente as proteínas albuminas 2S de amendoim e gergelim. O cronograma da sensibilização dos animais e investigação dos epítomos de células T pode ser visualizado na figura 10. Amostras de sangue do seio retro-orbital foram coletadas para avaliação sorológica de anticorpos IgE, IgG e IgG1 séricos nos dias 0 (pré-imune) e 36. O ensaio imunoenzimático de ELISA foi realizado conforme item 4.2.4.2.

Figura 10 - Cronograma esquemático da sensibilização e investigação de epítomos de células T.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após a sensibilização dos animais, cada grupo foi dividido em 2 subgrupos. Os animais do primeiro subgrupo foram eutanasiados para prosseguir com os ensaios de cultura de células e estimulação antigênica, proliferação de esplenócitos e produção de

citocinas. Os animais do segundo subgrupo permaneceram vivos para serem tratados com o peptídeo híbrido e realizado posteriormente as análises de cultura de células e estimulação antigênica, proliferação de esplenócitos e produção de citocinas.

4.2.4.3.1. Cultura de células e estimulação antigênica

Após onze dias da última imunização (dia 29), 3 animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os baços foram retirados assepticamente e pressionados sobre coador de células de 40 µm, posicionado sobre um tubo de 50 mL estéril, com auxílio de um êmbolo de uma seringa de 5 mL. Após, foi adicionado 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) para obtenção da suspensão de células esplênicas, que foram submetidas a centrifugação por 5 minutos a 400 g. Após a centrifugação, o sobrenadante das suspensões celulares foi descartado e os precipitados de células foram ressuspensos com 2 mL de tampão de lise de eritrócitos, tampão ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*), e deixado no tampão durante dois minutos. Após decorrido este tempo, foi adicionado 10 mL de PBS 1x contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e centrifugado novamente por 5 minutos a 400 x g. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados de células foram ressuspensos com 1 mL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% SFB, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e 1% de solução de penicilina/estreptamicina (LGC). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi retirada para contagem de células em câmara de Neubauer, para determinar a concentração de esplenócitos por mililitro. Após a contagem, 5×10^4 de esplenócitos foram adicionados por poço de placa de cultura celular de 96 poços. Os esplenócitos foram cultivados por 72 horas, em estufa úmida a 37° C com 5% de CO₂, na presença ou não de 2 mg/mL de proteínas albuminas 2S de gergelim e de amendoim, e com o peptídeo híbrido de células T (200 µg/mL), totalizando o volume de 100 µL de meio de cultivo por poço, para avaliação quanto a capacidade proliferativa de células e de produção de citocinas do baço.

4.2.4.3.2. Avaliação da proliferação dos esplenócitos

A avaliação da proliferação dos esplenócitos oriundas do baço de camundongos Balb/c foi realizada pelo método de MTT ((3-(4,5-dimeThyl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)), também chamado de sal de tetrazólio. Os esplenócitos dos camundongos imunizados com proteínas albuminas 2S de amendoim e gergelim foram cultivados por 72 horas, como descrito no item anterior. Após as 72 horas, foi adicionado 10 µL de solução de MTT, na concentração de 10 mg/mL, por poço na placa de cultivo, e incubado

em estufa úmida a 37° C com 5% de CO₂ por 3 horas. Após decorrido o tempo de incubação, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 600 x g, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de solução de Isopropanol com ácido clorídrico (HCl) para dissolver os cristais de formazan, gerado com a redução do MTT pelas mitocôndrias. A densidade ótica da coloração dos poços da placa foi analisada em leitor de microplacas (Epoch) com filtro de 570 nm, para determinar as intensidades relativas de proliferação.

4.2.4.3.3. Avaliação da produção de citocinas das células do baço

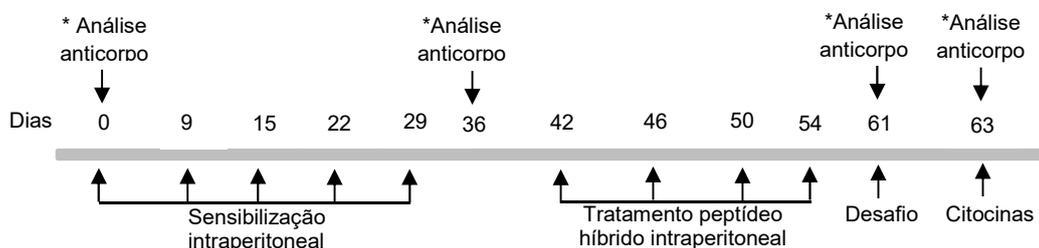
O ensaio de dosagem de citocinas foi realizado em colaboração com a Dr.^a Rebeka da Conceição Souza e Dr. Fabrício Moreira Almeida, e a Msc. Juliana Azevedo da Silva do Laboratório de Biologia do Reconhecer da UENF. Os esplenócitos dos camundongos imunizados com proteínas albuminas 2S de amendoim e gergelim foram cultivados por 72 horas, como descrito no item 4.2.4.3.1. Após as 72 h a 37°C, os sobrenadantes da cultura celular foram coletados para avaliar o perfil de resposta Th1/Th2. Foi utilizado o kit *Cytometric Beads Array* (CBA, marca – BD) para a dosagem das citocinas: IL-2, INFγ, TNF-α, IL-4 e IL-5. Resumidamente, os padrões de citocinas foram reconstituídos com o diluente do ensaio. Após, os padrões foram diluídos através de diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32; 1:64; 1:128 e 1:256) para obter a curva padrão. Posteriormente, foram preparadas as esferas (*beads*) de captura para as citocinas, adicionando em um tubo 5 µL de cada *bead* de captura por amostra, obtendo assim o mix com as *beads* de captura. As amostras foram descongeladas e adicionado 25 µL de cada amostra em seu respectivo tubo, 25 µL do mix contendo as *beads* de captura e 25 µL do reagente de detecção PE, e em seguida os tubos foram levados para a incubação por 2 h à temperatura ambiente protegidos da luz. Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas utilizando 500 µL de tampão de lavagem e submetidas a centrifugação a 200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 300 µL de tampão de lavagem nas amostras para ressuspender os grânulos de esferas. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (*BectonDickinson*).

4.2.4.3.4. Tratamento com o peptídeo híbrido de células T

Após a síntese e confirmação do peptídeo híbrido de células T foi avaliado o perfil de resposta e a capacidade de induzir a produção de anticorpos. O peptídeo híbrido de células T foi preparado em tampão PBS junto com o adjuvante hidróxido de

alumínio. De posse dos camundongos sensibilizados previamente (subitem 4.2.4.3), o tratamento com o peptídeo híbrido de células T foi realizado conforme figura 11.

Figura 11 - Cronograma esquemático da sensibilização de camundongos e do tratamento com o peptídeo híbrido de células T.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após treze dias da última imunização (dia 29) os camundongos foram tratados via intraperitoneal com 200 μ g de peptídeo híbrido de células T na presença do adjuvante hidróxido de alumínio nos dias 42, 46, 50 e 54. Uma semana após o último tratamento (dia 61) os camundongos receberam o desafio com 100 μ g de albumina 2S de amendoim ou gergelim. Amostras de sangue do seio retro-orbital foram coletadas nos dias 61 e 63 para avaliação sorológica de anticorpos IgG, IgG1e IgE séricos, e também no dia 63 para análise de citocinas produzidas. As etapas de cultura de células e estimulação antigênica, avaliação da proliferação dos esplenócitos e avaliação da produção de citocinas foram realizadas de acordo com os subitens 4.2.4.3.1, 4.2.4.3.2 e 4.2.4.3.3.

4.2.4.3.5. Análise estatística

As comparações múltiplas foram realizadas por ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando Graph Pad Prism 5.0 para *Windows* (GraphPad Software, San Diego California USA), considerando-se valores de *p* menores que 0,05 como significativos.

5. Resultados

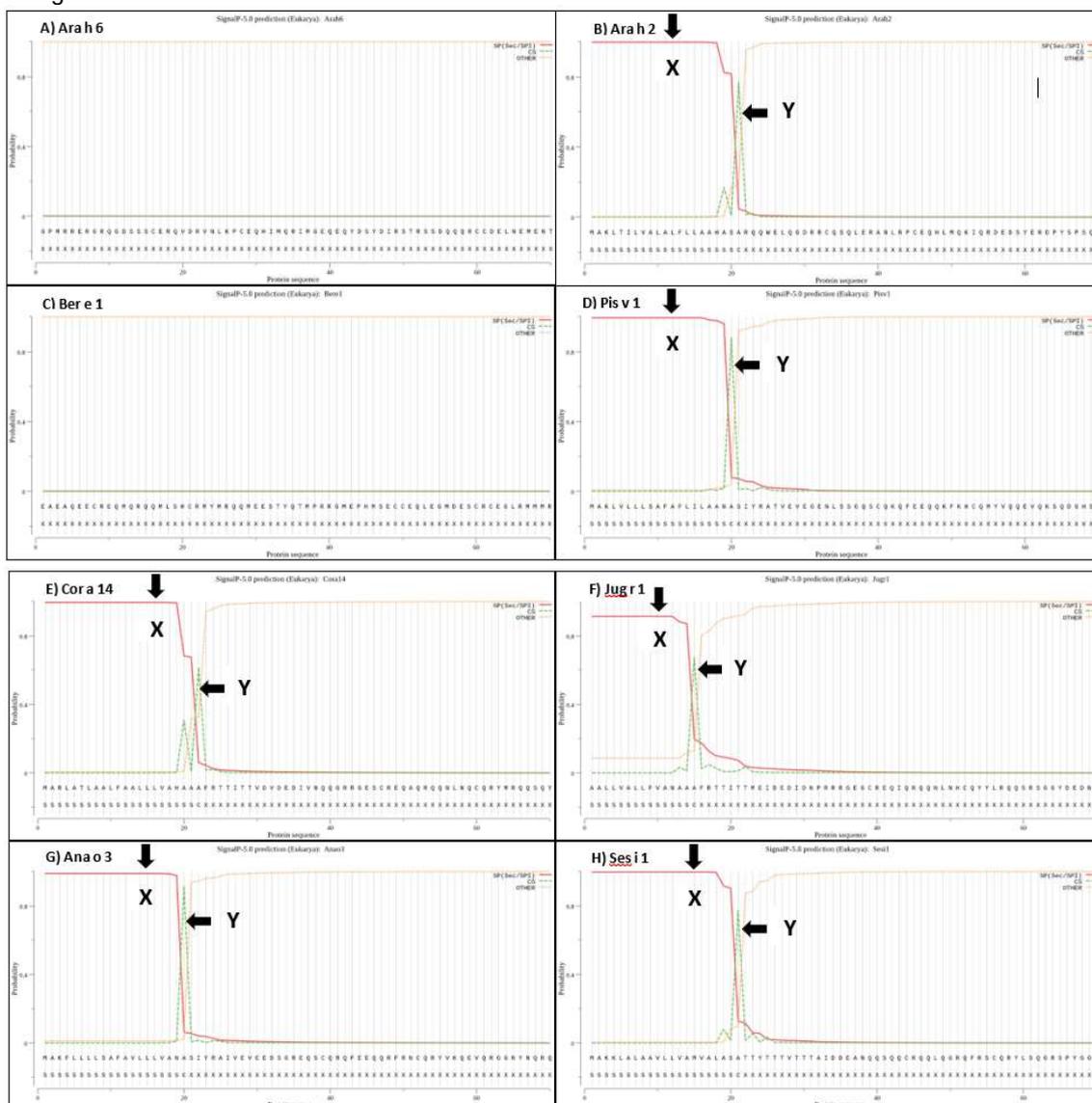
5.1. ETAPA I - Análise *in silico*

5.1.1. Predição de peptídeo sinal

Sabemos que o peptídeo sinal é uma pequena sequência de aminoácidos presente na maioria das proteínas que direciona sua passagem pela membrana do retículo endoplasmático (em eucariotos) e pela membrana plasmática (em procaríotos).

Com o processo de translocação da membrana, o peptídeo sinal sofre uma clivagem pela peptidase sinal, sendo então removidos (ARMENTEROS *et al.*, 2019). Desta forma, podemos considerar uma proteína madura quando ela não apresenta o peptídeo sinal (PETERSEN *et al.*, 2011). Após a submissão das sequências dos alérgenos à análise pelo programa *SignalP-5.0*, foram obtidas as seguintes previsões conforme a figura 12:

Figura 12 - Predição de peptídeo sinal. A – Ausência de peptídeo sinal no alérgeno Ara h 6, não havendo pico acima do limiar. B - Presença de peptídeo sinal no alérgeno Ara h 2, onde X corresponde a sequência de peptídeo sinal e Y corresponde ao sítio de clivagem. C - Ausência de peptídeo sinal no alérgeno Ber e 1, não havendo pico acima do limiar. D - Presença de peptídeo sinal no alérgeno Pis v 1, onde X corresponde a sequência de peptídeo sinal e Y corresponde ao sítio de clivagem. E - Presença de peptídeo sinal no alérgeno Cor a 14, onde X corresponde a sequência de peptídeo sinal e Y corresponde ao sítio de clivagem. F - Presença de peptídeo sinal no alérgeno Jug r 1, onde X corresponde a sequência de peptídeo sinal e Y corresponde ao sítio de clivagem. G - Presença de peptídeo sinal no alérgeno Ana o 3, onde X corresponde a sequência de peptídeo sinal e Y corresponde ao sítio de clivagem. H - Presença de peptídeo sinal no alérgeno Ses i 1, onde X corresponde a sequência de peptídeo sinal e Y corresponde ao sítio de clivagem.



Fonte: Elaborado pelo autor, previsões realizadas pelo software *SignalP-5.0*.

De acordo com a previsão pelo programa *SignalP-5.0* e posterior análise, podemos observar que os alérgenos Ara h 6 e Ber e 1 não possuem peptídeo sinal. Isso se deve ao fato de que as sequências dos alérgenos depositadas no PDB são sequências parciais das proteínas que carecem de aminoácidos na região do peptídeo sinal.

Todos os outros alérgenos apresentaram o peptídeo sinal conforme indicado com “X” na figura 12. Já os fragmentos identificados com “Y” demonstram a região da sequência do alérgeno que foi clivada para retirada do peptídeo sinal.

A partir da avaliação da existência de peptídeo sinal nas sequências proteicas pelo software *SignalP-5.0*, foi compilado na tabela 2 abaixo as sequências dos alérgenos sem os respectivos peptídeos sinais, que foram utilizadas nas análises seguintes.

Tabela 2 - Sequências proteicas dos alérgenos sem o peptídeo sinal.

Ara h 6	GPMRRERGRQGSSSCERQVDRVNLKPCQEQHIMQRIMGEQEQYDSYDIRSTRSSDQ QQRCCDELNEMENTQGCMEALQQIMENQCDRLQDRQMVQQFKRELMQLPQQCNF RAPQRCDLDVSGGRCS
Ara h 2	QWELQGDRRQCSSLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYERDPYSPSQDPYSPSPYDR RGAGSSQHQERCCNELNEFENNQRCEALQQIMENQSDRLQGRQQEQQFKRELRLN LPQQCGLRAPQRCDLDVESGGDRY
Ber e 1	EAEAQEECREQMQRQQLSHCRMYYMRQQMEESTYQTMPPRRGMPEPHMSECCEQLE GMDESCRCEGLRMMMRMMQQKEMQPRGEQMRRMRLAENIPSRCNLSPMRCPMG GSIAGF
Pis v 1	IYRATVEVEGENLSSGQSCQKQFEEQQKFKHCQMYVQQEVQKSQDGHSLTARINQRQ QCFKQCCQELQEVDKKCRQCQNLQEMVKRQQQQGQFRGEKQLQELYETASELPRMCNI SPSQGCQFSSPYWSY
Cor a 14	RTTITTVDVDEDIVNQQGRRGESCREQAQRQQLNQCQRYMRQSSQYGSYDGSNQQ QQQELEQCCQQLRQMDERCRCCEGLRQAVMQQQGEMRGEEMREVMETARDLPNQC RLSPQRCEIRSARF
Jug r 1	RTTITTMEIDEDIDNPRRRGEGCREQIQRQQLNHCQYYLRQQSRSGGYDEDNQRQH FRCCQQLSQMDEQCQCEGLRQVRRQQQQQGLRGEEMEEMVQSARDLPNECGIS SQRCEIRRSWF
Ana o 3	YRAIVEVEEDSGREQSCQRQFEEQQRFRNCQRYVKQEVQRGGRYNQRQESLRECCQ ELQEVDRRCRCQNLQEMVRLQQQEQIKGEEVRELYETASELPRICISPSQGCQFQS SY
Ses i 1	YTTTITTTAIDDEANQQSQCRQQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGEEDEVLEMSTG NQQSEQSLRDCCQQLRNVDERCRCCEAIRQAVRQQQQEGGYQEGQSQQVYQRARDL PRRCNMRPQQCQFRVIFV

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2. Alinhamento das sequências e construção da árvore filogenética

O alinhamento múltiplo das sequências proteicas é uma ferramenta importante para o processamento dos dados biológicos, que nos permite estimar a árvore filogenética e nos indica de maneira crítica os resíduos de aminoácidos que compõe a sequência dos alérgenos.

O Clustal Ômega é um programa que consiste no método progressivo de alinhamento baseado na criação de uma árvore guia, que tem o objetivo de guiar o alinhamento, e na utilização do algoritmo *mBed*, o que permite o processamento de muitos dados. Isto o difere das versões anteriores, visto que, a criação de árvores filogenéticas é uma etapa que requer mais trabalho, sendo calculada pelas distâncias pareadas das sequências. Para melhorar o refinamento do alinhamento, o programa sofreu algumas melhorias como a utilização do algoritmo *HHalign*, que é um alinhador perfil-perfil, que permite às sequências serem alinhadas em maiores grupos (SIEVERS; HIGGINS, 2014).

O Clustal Ômega pode ser utilizado de forma gratuita e online, o que nos permite o processamento de grandes quantidades de sequências proteicas apresentando resultados rápidos e precisos (SIEVERS; HIGGINS, 2018). Neste trabalho, o Clustal Ômega apresentou o alinhamento múltiplo das sequências mostrado na figura 13.

Figura 13 - Alinhamento múltiplo das sequências primárias dos alérgenos de amendoim (Ara h 2 e 6), pistache (Pis v 1), castanha de caju (Ana o 3), gergelim (Ses i 1), castanha do Brasil (Ber e 1), avelã (Cor a 14) e noz (Jug r 1).

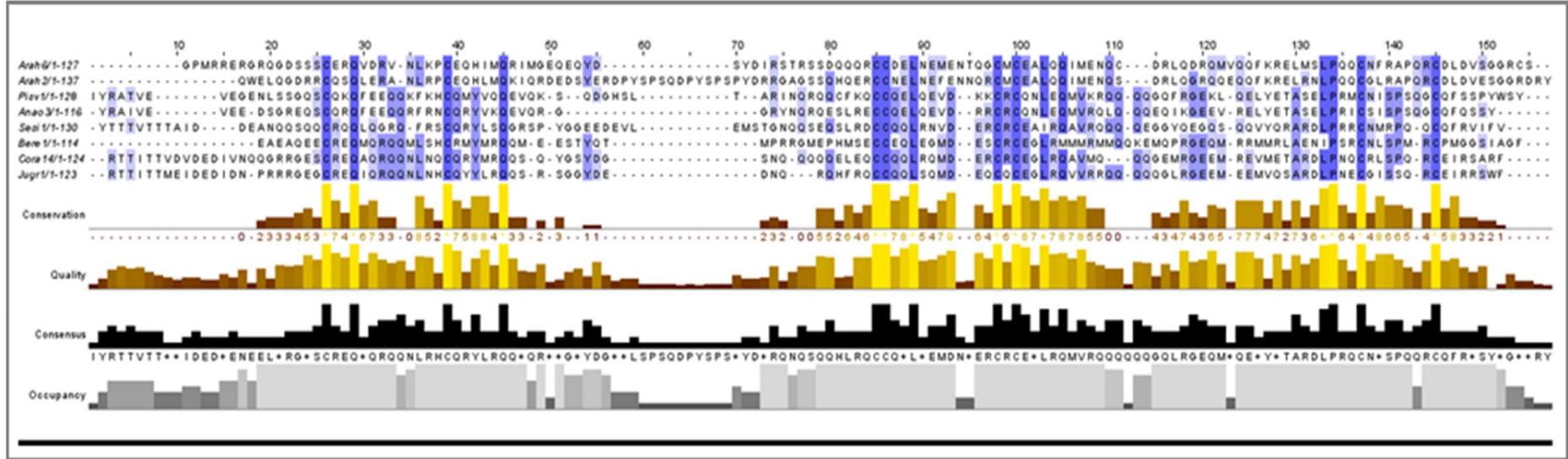


Fonte: Elaborado pela autora, alinhamento realizado pelo programa Clustal Ômega (1.2.4).

O alinhamento das sequências proteicas permitiu identificar algumas regiões conservadas entre os alérgenos, demonstrando que os resíduos de cisteínas se alinharam e destacando em azul os resíduos de ácido glutâmico, um aminoácido importante para a interação com a IgE. Todas essas informações e o padrão de regiões conservadas contribuem para a seleção e síntese de peptídeos alvos para criação de uma possível terapia para o tratamento de alergias.

Em seguida, este alinhamento pôde ser visualizado no programa *Jalview*, conforme figura 14, destacando em azul a similaridade entre as sequências.

Figura 14 - Visualização no programa *Jalview* do múltiplo alinhamento das seqüências proteicas dos alérgenos das oleaginosas realizado no software Clustal Ômega. Destaca-se em azul a similaridade dos resíduos de aminoácidos.



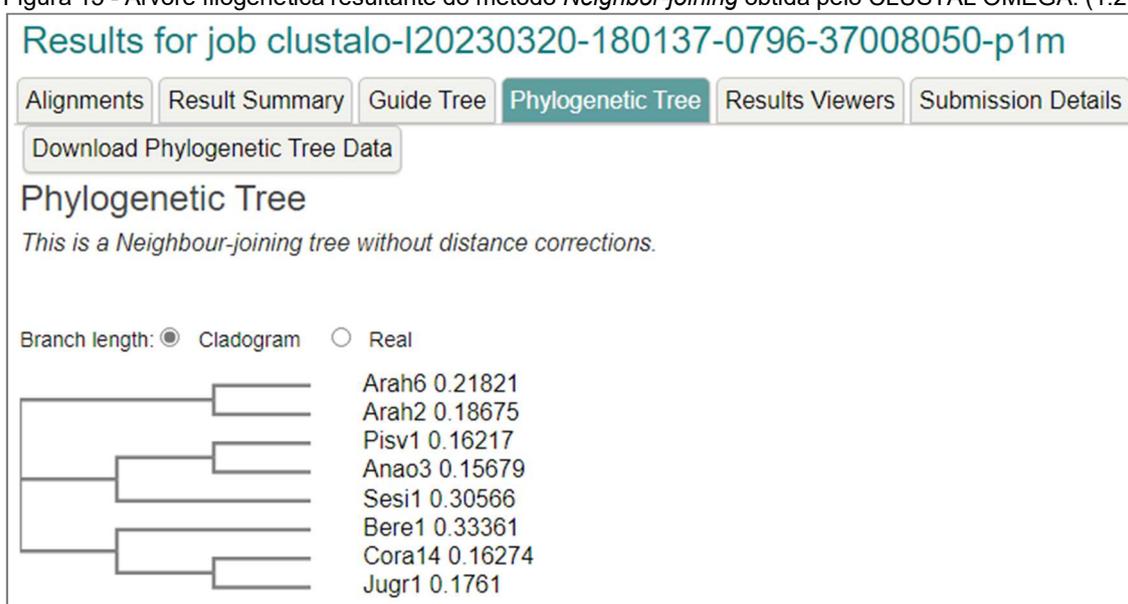
Fonte: Alinhamento visualizado no programa *Jalview*.

Após o alinhamento, o Clustal Ômega por padrão nos fornece um cladograma representando a árvore filogenética, que foi construída através do método *Neighbor-joining* sem correções de distância, conforme os parâmetros definidos previamente.

O estudo da árvore filogenética iniciou desde a época de Charles Darwin, no século 19, e se estende até hoje por pesquisadores. A árvore filogenética nos permite compreender a evolução das espécies, as transições das espécies e como elas estão relacionadas entre si (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020).

A representação da árvore filogenética demonstrada na figura 15, nos permite avaliar que existem relações de ancestralidades entre os oito alérgenos deste estudo.

Figura 15 - Árvore filogenética resultante do método *Neighbor-joining* obtida pelo CLUSTAL ÔMEGA. (1.2.4).



Fonte: Obtida pelo programa Clustal Ômega (1.2.4).

5.3. Avaliação das propriedades físico-químicas

As características físico-químicas dos alérgenos são importantes nos estudos pois, elas podem influenciar na interação antígeno-anticorpo, interação esta que pode ser desestabilizada por concentrações elevadas de sal, alterações extremas de pH e ação de detergentes (MURPHY *et al.*, 2010).

Após a submissão das sequências proteicas à análise pelo programa *ProtParam*, foram obtidas algumas características físico-químicas dos alérgenos conforme tabela 3:

Tabela 3 – Características físico-químicas dos alérgenos obtidas *in silico* pelo programa *ProtParam*. (kDa = kilodaltons).

Características	Alérgenos							
	Ara h 6	Ara h 2	Ber e 1	Pis v 1	Cor a 14	Jug r 1	Ana o 3	Ses i 1
Número de aminoácidos	127	160	114	149	147	139	138	153
Massa molecular	~ 15 kDa	~ 19 kDa	~ 14 kDa	~ 18 kDa	~ 17 kDa	~ 16 kDa	~ 16 kDa	~ 17 kDa
Ponto isoelétrico teórico	5.24	5.96	6.20	8.06	6.59	5.75	5.68	8.47
Nº total de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu)	21	24	17	15	19	20	20	16
Nº total de resíduos carregados positivamente (Arg +Lys)	18	22	16	17	19	18	19	19
Índice de Instabilidade	68.66 (instável)	72.41 (instável)	77.74 (instável)	53.07 (instável)	51.26 (instável)	77.89 (instável)	66.04 (instável)	68 (instável)
Índice alifático	44.49	59.25	22.46	53.07	61.16	77.89	74.86	63.14

Fonte: Elaborada pela autora, dados obtidos pelo programa *ProtParam*.

Os dados descritos na tabela 3 referem-se às características físico-químicas dos alérgenos selecionados. São dados importantes para uma melhor compreensão das funções bioquímicas dos alérgenos. Os oito alérgenos utilizados nesta análise apresentam sequências que compreendem de 114 a 160 resíduos de aminoácidos. São alérgenos de massa molecular baixa, que variam de 14 (Ber e 1) a 19 kDa (Ara h 2).

Quanto ao ponto isoelétrico (pI), somente os alérgenos Pis v 1 e Ses i 1 foram preditos com carga elétrica líquida positiva, ou seja, indicam uma natureza básica. Já os alérgenos Ara h 6, Ara h 2, Ber e 1, Cor a 14, Jug r 1 e Ana o 3 indicam uma natureza ácida.

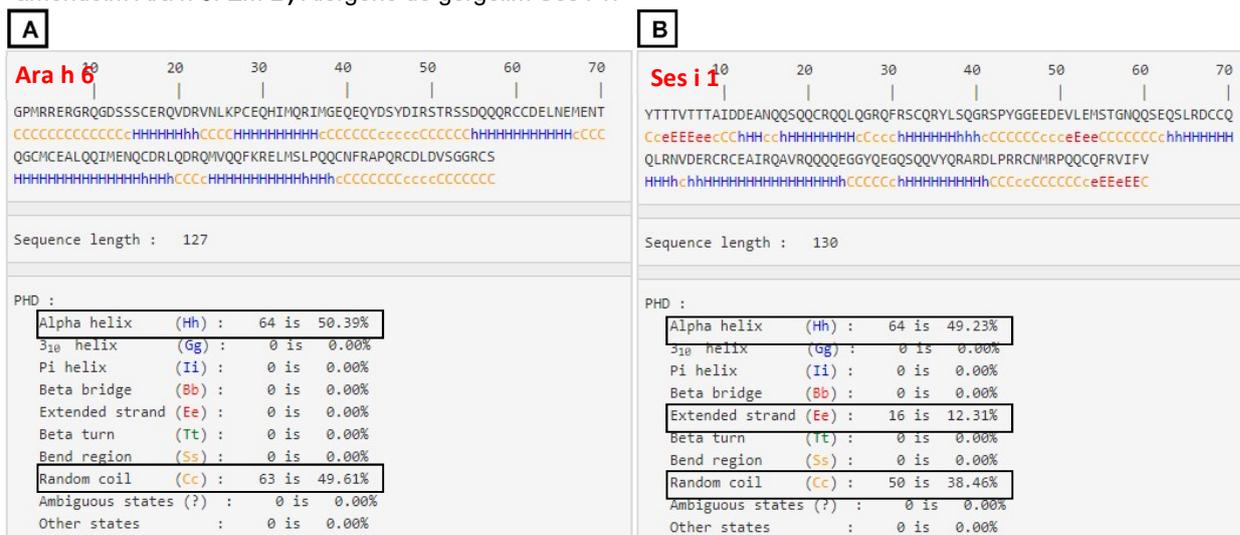
O Ara h 2 foi o alérgeno que apresentou mais resíduos carregados negativamente (Asp + Glu), e em contrapartida, o Pis v 1 apresentou menos resíduos. Quanto ao número de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys) o Ara h 2 apresentou mais resíduos e o Ara h 6 e Jug r 1 apresentaram menos resíduos.

Em relação ao índice de instabilidade, todos os oitos alérgenos do nosso estudo foram preditos como instáveis pelo servidor apresentando valor calculado superior a 40. Já o índice alifático dos oito alérgenos variam de 22.46 para o alérgeno Ber e 1 a 77.89 para o alérgeno Jug r 1.

5.4. Predição da estrutura secundária

As estruturas secundárias dos epítomos imunodominantes preditas pelo software PHD mostram uma predominância do tipo alfa hélice (α -hélice), seguida numa proporção mediana da estrutura do tipo randômica para os alérgenos Ara h 6, de amendoim, e Ses i 1, de gergelim, conforme figura 16. As predições dos outros alérgenos estão demonstradas no apêndice A.

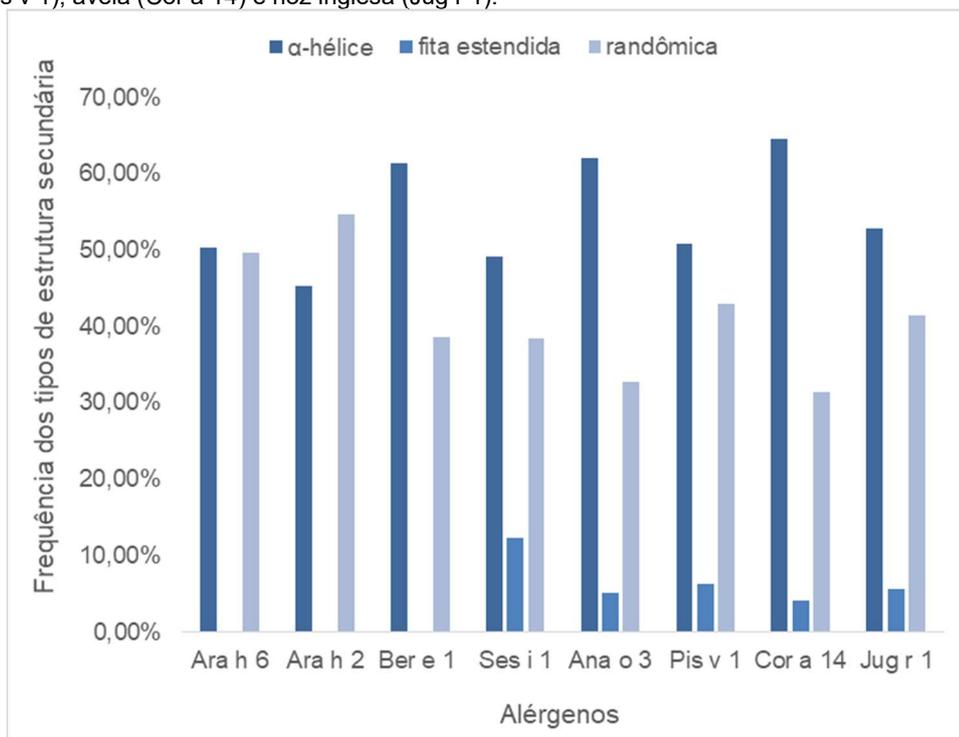
Figura 16 - Estruturas secundárias dos alérgenos preditas pelo software PHD. Em **A)** Alérgeno de amendoim Ara h 6. Em **B)** Alérgeno de gergelim Ses i 1.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com base nas predições das estruturas secundárias, a figura 17 ilustra a frequência dos tipos de estrutura secundária predita para os alérgenos em questão, destacando nas barras em azul a predominância da estrutura do tipo α -hélice.

Figura 17 - Frequência dos tipos de estrutura secundária predita pelo software PHD. Alérgenos de amendoim (Ara h 6 e Ara h 2), castanha do Brasil (Ber e 1), gergelim (Ses i 1), castanha de caju (Ana o 3), pistache (Pis v 1), avelã (Cor a 14) e noz inglesa (Jug r 1).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os alérgenos Ses i 1, Ana o 3, Pis v 1, Cor a 14 e Jug r 1 apresentaram em baixa porcentagem a estrutura do tipo fita estendida. Para os oito alérgenos não houve predição de folha beta.

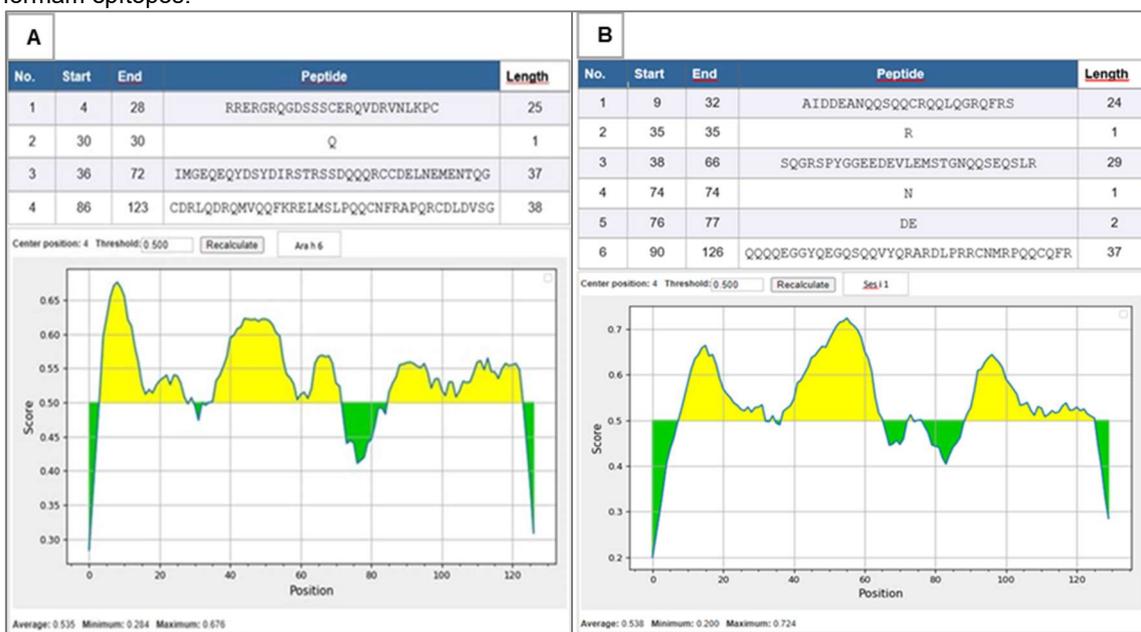
5.5. Predição de epítomos de células B

Durante muito tempo diversas pesquisas foram realizadas a fim de descobrir peptídeos que fossem capazes de mimetizarem os epítomos das proteínas com características antigênicas e/ou imunogênicas. Para isso foram empregadas técnicas de predição de epítomos que possibilita o design de moléculas e que possam vir a substituir o papel dos antígenos na indução da produção de anticorpos (VAN REGENMORTEL, 2006).

A identificação de epítomos de células B em proteínas alergênicas vem sendo realizada através de ferramentas de bioinformática a fim de compreender as interações antígeno-anticorpo. Neste estudo, foram empregados três métodos de predição: *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0*, *BcePred* e *BCPreds*, para os oito alérgenos citados. Uma análise comparativa dos três métodos utilizados foi realizada.

As predições para os alérgenos Ara h 6 (amendoim) e Ses i 1 (gergelim) são apresentadas nas figuras 18, 19 e 20. A figura 18, empregando o método *Bepipred* mostra as predições destacando as escalas de propensões de epítomos ao longo das sequências completas dos alérgenos Ara h 6 e Ses i 1. As predições para os demais alérgenos por esta ferramenta são apresentadas nos apêndices de B ao G.

Figura 18 - Epítomos de células B preditos pelo método *Bepipred* demonstrando o gráfico da escala de propensão. Em **A**) Alérgeno de amendoim **Ara h 6**, considerando os valores: (Mínimo - 0,284; Máximo 0,676; Limiar 0,535). Em **B**) Alérgeno de gergelim **Ses i 1**, considerando os valores: (Mínimo - 0,200; Máximo 0,724; Limiar 0,538). O eixo horizontal (score 0.50) indica o número de aminoácidos da sequência completa dos alérgenos. O eixo vertical indica as regiões preditas para os epítomos, destacando as regiões em amarelo os aminoácidos que formam os epítomos lineares e na cor verde os aminoácidos que não formam epítomos.



Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0*.

As figuras 19 e apêndices H ao M, mostram as predições pelo método *BcePred*, e as figuras 20 e apêndices N ao S mostram as predições pelo método *BCPreds*.

Figura 19 - Epítomos de células B preditos pelo método *BcePred*. Em **A**) Alérgeno de amendoim **Ara h 6**. Em **B**) Alérgeno de gergelim **Ses i 1**. Em vermelho está descrito a sequência completa do alérgeno, e em azul destaca-se as predições realizadas de acordo com as características físico-químicas dos aminoácidos.

A	
Sequence	1GPMRRERGRQGDSSSCERQVDRVNLKPCQEQHIMQRIIMGEQEYDYSYDIRSTRSSDQQQRCCDELNEMENTQGCMCEALQQIMENQC DRLQDRQMVQQFKRELSLPPQQCNFRAPQRCCLDVSGGRCS ¹²⁷
Hydrophilicity	1GPMRRERGRQGDSSSCERQVDRVNLKPCQEQHIMQRIIMGEQEYDYSYDIRSTRSSDQQQRCCDELNEMENTQGCMCEALQQIMENQC DRLQDRQMVQQFKRELSLPPQQCNFRAPQRCCLDVSGGRCS ¹²⁷
Flexibility	1GPMRRERGRQGDSSSCERQVDRVNLKPCQEQHIMQRIIMGEQEYDYSYDIRSTRSSDQQQRCCDELNEMENTQGCMCEALQQIMENQC DRLQDRQMVQQFKRELSLPPQQCNFRAPQRCCLDVSGGRCS ¹²⁷
Exposed Surface	1GPMRRERGRQGDSSSCERQVDRVNLKPCQEQHIMQRIIMGEQEYDYSYDIRSTRSSDQQQRCCDELNEMENTQGCMCEALQQIMENQC DRLQDRQMVQQFKRELSLPPQQCNFRAPQRCCLDVSGGRCS ¹²⁷
Polarity	1GPMRRERGRQGDSSSCERQVDRVNLKPCQEQHIMQRIIMGEQEYDYSYDIRSTRSSDQQQRCCDELNEMENTQGCMCEALQQIMENQC DRLQDRQMVQQFKRELSLPPQQCNFRAPQRCCLDVSGGRCS ¹²⁷

B	
Sequence	1YTTVTTTAIDDEANQQSQQCRRQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGEEDEVLEMSTGNQQSEQSLRDCCQQLRNVDRCRCCEAIRQAVRQQQEGGYQEGQSQQVYQARADLP RRRCNMRPQQCFRVI ¹³⁰
Hydrophilicity	1YTTVTTTAIDDEANQQSQQCRRQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGEEDEVLEMSTGNQQSEQSLRDCCQQLRNVDRCRCCEAIRQAVRQQQEGGYQEGQSQQVYQARADLP RRRCNMRPQQCFRVI ¹³⁰
Flexibility	1YTTVTTTAIDDEANQQSQQCRRQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGEEDEVLEMSTGNQQSEQSLRDCCQQLRNVDRCRCCEAIRQAVRQQQEGGYQEGQSQQVYQARADLP RRRCNMRPQQCFRVI ¹³⁰
Exposed Surface	1YTTVTTTAIDDEANQQSQQCRRQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGEEDEVLEMSTGNQQSEQSLRDCCQQLRNVDRCRCCEAIRQAVRQQQEGGYQEGQSQQVYQARADLP RRRCNMRPQQCFRVI ¹³⁰
Polarity	1YTTVTTTAIDDEANQQSQQCRRQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGEEDEVLEMSTGNQQSEQSLRDCCQQLRNVDRCRCCEAIRQAVRQQQEGGYQEGQSQQVYQARADLP RRRCNMRPQQCFRVI ¹³⁰

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método *BcePred*.

Figura 20 - Previsões de epítomos de células B através do método *BCPred*. Em **A**) Alérgeno do amendoim **Ara h 6**. Em **B**) alérgeno do gergelim **Ses i 1**. Destaca-se em “E” na cor vermelha os resíduos de aminoácidos correspondentes aos epítomos de células B preditos, visto que acima encontra-se a sequência completa do alérgeno.

A		
Position	Epítome	Score
1	GPMRRERGRQGDSSSCERQV	0.992
51	TRSSDQQQRCCDELNEMENT	0.828
78	LQQIMENQCRLQDRQMVQQ	0.8

B		
Position	Epítome	Score
88	VRQQQEGGYQEGQSQQVYQ	1
45	GGEEDEVLEMSTGNQQSEQS	0.983
1	YTTVTTTAIDDEANQQSQQ	0.937
67	DCCQQLRNVDRCRCCEAIRQ	0.842
109	ARDLP	0.758

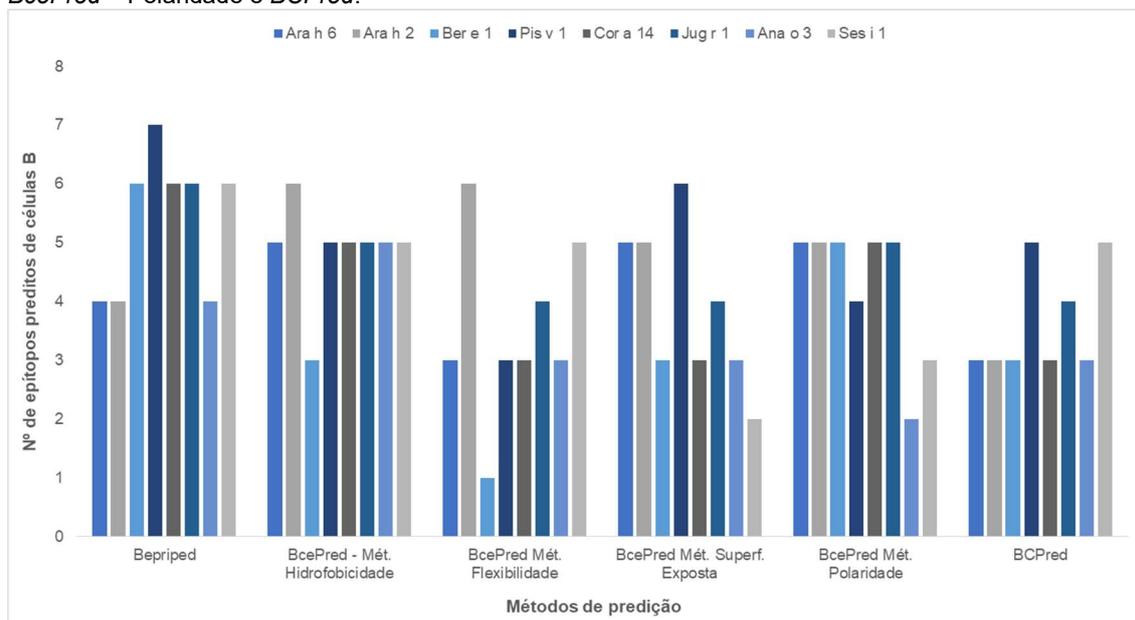
1	11	21	31	41	51	60
GPMRRERGRQGDSSSCERQVDRVNLKPCQEQHIMQRIIMGEQEYDYSYDIRSTRSSDQQQRCC 60						
EE 120						
CDELNEMENTQGCMCEALQQIMENQCRLQDRQMVQQFKRELSLPPQQCNFRAPQRCCLDVSGGRCS 127						

1	11	21	31	41	51	60
YTTVTTTAIDDEANQQSQQCRRQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGEEDEVLEMSTGNQQ 60						
EE 120						
SEQSLRDCCQQLRNVDRCRCCEAIRQAVRQQQEGGYQEGQSQQVYQARADLP						
RRRCNMRPQQCFRVI 130						
EEEEEEEE..						

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método *BCPred*.

Após a predição dos epítomos de células B pelos softwares *Bepipred*, *BcePred* (através dos métodos Hidrofobicidade, Flexibilidade, Superfície Exposta e Polaridade) e *BCPred* demonstramos na figura 21 o número total de epítomos preditos para os alérgenos de acordo com cada software de predição.

Figura 21 – Número de epítomos de células B preditos para os alérgenos de acordo com os métodos de predição *Bepiped*, *BcePred* – Hidrofobicidade, *BcePred* – Flexibilidade, *BcePred* – Superfície Exposta, *BcePred* – Polaridade e *BCPred*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Usando os três programas de predições foi possível prever um total de 204 epítomos de células B a partir dos 8 alérgenos. Após análise de todos os epítomos preditos, compilamos na tabela 4 as 27 prováveis regiões epitópicas dos alérgenos que foram comuns nos três programas de predição.

Tabela 4 – Compilado de epítomos de células B preditos e comuns nos três softwares *Bepipred*, *BcePred* e *BCPred*.

Alérgeno	Epítomos de células B
Ara h 6	RRERGRQGDSSSCERQV
	RSSDQQQ
	NEMENT
	CDRLQDRQMVQQ
Ara h 2	QKIQRDEDSYERDPYSPSQDPYSP
	QQFKRELRN
Ber e 1	QEECREQMQRQ
	MPRRGMEPH
	QQKEMQPRGEQMR
Pis v 1	EGENLSSGQSCQKQFEEQQKFKH
	QQEVQKSQDG
	NQRQQ
	KRQQQQGQFRGEKLQELYE
	SPSQGCQ
Cor a 14	DIVNQQGRRGESCREQAQR
	GSYDGSNQQQQELE
	QGEMRGEEMREVME
Jug r 1	IDNPRRRGEGCREQIQRQQ
	RQQSRSGYDEDNQRQHF
	RRQQQQQLRGEEMEEMVQ
	ECGISSQRCEIRR
Ana o 3	EEDSGREQSCQRQFEE
	GEEDEVLEMSTGNQQSEQ
	QQQQEGGYQEGQSQVYQRARDLPRRCN
	MRP
Ses i 1	AIDDEANQQSQQ
	GEEDEVLEMSTGNQQSEQ
	QQQQEGGYQEGQSQVYQRARDLPRRCN
	MRP

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelos métodos *Bepipred*, *BcPred* e *BCPred*.

5.6. Predição de epítomos de células T

Para selecionar peptídeos com potencial antigênico torna-se necessário analisar a afinidade entre as sequências proteicas e as moléculas de HLA. Existem alguns antígenos que são chamados de promíscuos, visto que eles são reconhecidos por várias moléculas de HLA. Caso esses antígenos sejam selecionados, a possibilidade de reconhecimento a um número elevado de indivíduos pode ser aumentada, e isso consequentemente aumenta a possibilidade de indução do sistema imune, pois sabemos que o HLA dos indivíduos pode sofrer modificações por ser uma molécula polimórfica (WIENS *et al.*, 2013).

Neste trabalho utilizamos o programa NetMHCII para prever a capacidade de ligação dos peptídeos presentes nos alérgenos das oleaginosas à molécula de MHC, levando em conta a cobertura de 14 moléculas DR do MHC da classe II de humano.

O programa NetMHCII previu um total de 204 epítomos de células T. Destes, 17 foram classificados como fortes ligantes, conforme mostrado na tabela 5.

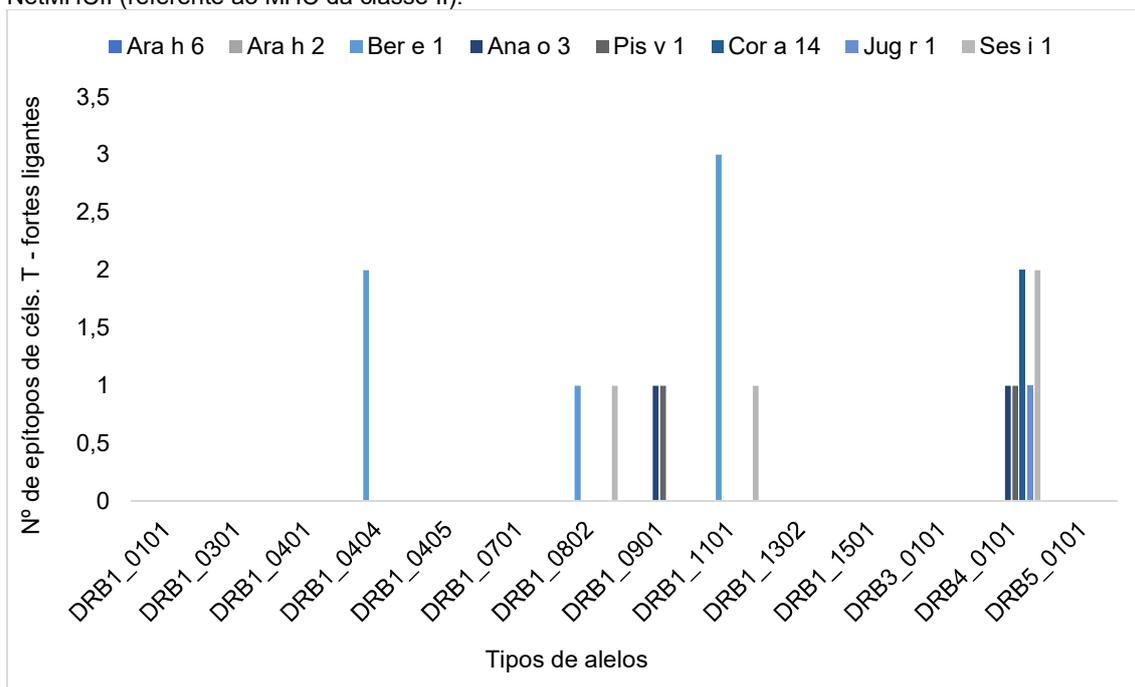
Tabela 5 - Afinidade de ligação dos alérgenos das oleaginosas aos diferentes tipos de alelos de HLA calculado pelo método de redes neurais NetMHCII classificados como **fortes ligantes**. As colunas na tabela indicam o alérgeno, a posição do alérgeno, os epítomos preditos, o núcleo de ligação dos epítomos preditos determinado a partir da estrutura da proteína, a restrição dos alelos, a afinidade de ligação e o nível de ligação, onde o SB indica um epítomo de forte ligação.

Alérgeno	Posição	Epítomo predito	Núcleo de ligação do epítomo	Tipo de HLA	1-log50k (afinidade de ligação)	Nível de ligação
Ber e 1	63	EGLRMMRMMQKEM	GLRMMRMM	DRB1_0404	0.7263	SB
	83	QMRMMRLAENIPSR	MMRLAENIP		0.6934	SB
	85	RRMMRLAENIPSRCN	MRLAENIPS	DRB1_0802	0.5999	SB
	32	STYQTMPRRGMPEPHM	YQTMPRRGM	DRB1_1101	0.8069	SB
	63	EGLRMMRMMQKEM	LRMMRMMQ		0.8333	SB
	81	GEQMRRMMRLAENIP	MRRMMRLAE		0.7830	SB
Pis v 1	109	RMCNISPSQGCQFSS	ISPSQGCQF	DRB1_0901	0.7131	SB
	30	KHCQMYVQEVQKSQ	MYVQEVQK	DRB4_0101	0.7006	SB
Cor a 14	78	EGLRQAVMQQGEMR	GLRQAVMQQ	DRB4_0101	0.7060	SB
	80	LRQAVMQQGEMRGE	AVMQQGEM		0.6691	SB
Jug r 1	35	HCQYYLRQQSRGGY	YLRQQSRSG	DRB4_0101	0.6619	SB
Ana o 3	100	RICSISPSQGCQFQS	ISPSQGCQF	DRB1_0901	0.7145	SB
	70	LEQMVRQLQQEQIK	MVRQLQQE	DRB4_0101	0.7074	SB
Ses i 1	80	RCEAIRQAVRQQQEQE	IRQAVRQQQ	DRB1_0802	0.6410	SB
	27	GRQFRSCQRYLSQGR	FRSCQRYLS	DRB1_1101	0.7761	SB
	81	CEAIRQAVRQQQEG	AIRQAVRQQ	DRB4_0101	0.6734	SB
	83	AIRQAVRQQQEGGY	AVRQQQEG		0.6698	SB

Fonte: Elaborado pela autora.

Vale ressaltar, que para os alérgenos de amendoim (Ara h 6 e Ara h 2) não foram preditos nenhum epítomo classificados como fortes ligantes, assim, eles não foram mencionados no quadro acima. Outra informação importante, é que para alguns alelos como DRB1_0101, DRB1_0301, DRB1_0401, DRB1_0405, DRB1_0701, DRB1_1302, DRB1_1501, DRB3_0101 e DRB5_0101 não foram preditos nenhum epítomo classificado como forte ligante conforme mostrado na figura 22.

Figura 22 - Número de epítomos de células T classificados como fortes ligantes preditos de acordo com a afinidade dos alérgenos aos 14 tipos de alelos de HLA - DR calculado pelo método de redes neurais NetMHCII (referente ao MHC da classe II).



Fonte: Elaborado pela autora.

Outros 43 epítomos preditos foram classificados como fracos ligantes, como mostrado na tabela 6.

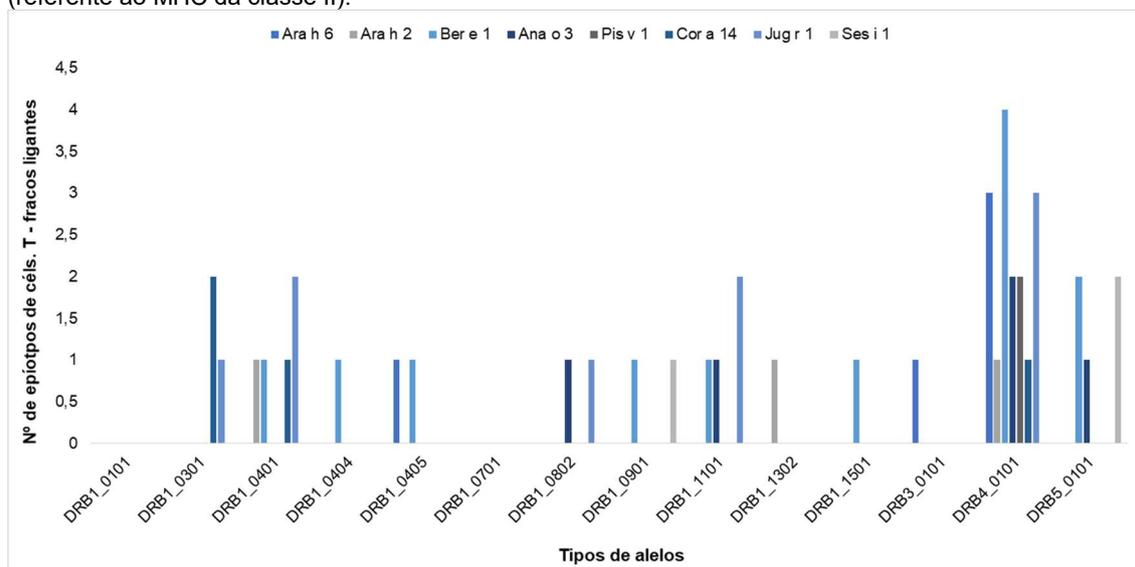
Tabela 6 - Afinidade de ligação dos alérgenos aos diferentes tipos de alelos de HLA calculado pelo método de redes neurais NetMHCII classificados como **fracos ligantes**. WB indica um epítipo de fraca ligação.

Alérgeno	Posição	Epítipo predito	Núcleo de ligação do epítipo	Tipo de HLA	1-log50k (afinidade de ligação)	Nível de ligação
Ara h 6	95	VQQFKRELMSLPQQC	FKRELMSLP	DRB1_0405	0.6282	WB
	93	QMVQQFKRELMSLPQ	FKRELMSLP	DRB3_0101	0.5035	WB
	28	CEQHIMQRIMGEQEQ	QHIMQRIMG	DRB4_0101	0.5634	WB
	92	RQMVQQFKRELMSLP	MVQQFKREL		0.5919	WB
	96	QQFKRELMSLPQQCN	ELMSLPQQC		0.5553	WB
Ara h 2	102	QEQQFKRELRLNPQQ	FKRELRLNP	DRB1_0401	0.5503	WB
	84	EALQQIMENQSDRLQ	IMENQSDRL	DRB1_1302	0.6374	WB
	23	EQHLMQKIQRDEDSY	QHLMQKIQR	DRB4_0101	0.6049	WB
Ber e 1	85	RRMMRLAENIPSRCN	MRLAENIPS	DRB1_0401	0.6284	WB
	97	RCNLSPMRCPMGGSI	NLSPMRCPM	DRB1_0404	0.6431	WB
	83	QMRRMRLAENIPSR	MRLAENIPS	DRB1_0405	0.6085	WB
	83	QMRRMRLAENIPSR	MRLAENIPS	DRB1_0901	0.5662	WB
	84	MRRMRLAENIPSRC	MRLAENIPS	DRB1_1101	0.6423	WB
	14	RQQMLSHCRMVYMRQQ	MLSHCRMVY	DRB1_1501	0.5830	WB
	8	CREQMQRQQMLSHCR	QMQRQQMLS	DRB4_0101	0.5870	WB
	20	HCRMVYMRQQMEESTY	YMRQQMEES		0.6377	WB
	59	SCRCEGLRMMMRMMQ	GLRMMMRMM		0.5979	WB
	82	EQMRRMRLAENIPS	MMRLAENIP		0.6161	WB
	12	MQRQQMLSHCRMVYMR	RQQMLSHCR	DRB5_0101	0.7274	WB
61	RCEGLRMMMRMMQK	CEGLRMMMR	0.6139		WB	
Pis v 1	26	QQKFKHCQMYVQQEV	KFKHCQMYV	DRB4_0101	0.5481	WB
	79	LEQMVKRQQQQGQFR	MVKRQQQQG		0.6211	WB
Cor a 14	3	TITVDVDEDIVNQQ	VDVDEDIVN	DRB1_0301	0.5381	WB
	31	QQNLNQCQRYMRQQS	LNQCQRYMR		0.5739	WB
	36	QCQRYMRQQSQYGSY	YMRQQSQYG	DRB1_0401	0.5624	WB
	36	QCQRYMRQQSQYGSY	YMRQQSQYG	DRB4_0101	0.6015	WB
Jug r 1	4	ITTMEIDEDIDNPRR	MEIDEDIDN	DRB1_0301	0.5081	WB
	24	REIQRQQNLNHCQY	IQRQQNLNH	DRB1_0401	0.5595	WB
	36	CQYYLRQQSRSGGYD	YLRQQSRSG		0.5303	WB
	75	EGLRQVRRQQQQQG	LRQVRRQQ	DRB1_0802	0.5791	WB
	35	HCQYYLRQQSRSGGY	YLRQQSRSG	DRB1_1101	0.6129	WB
	75	EGLRQVRRQQQQQG	LRQVRRQQ		0.6317	WB
	23	CREIQRQQNLNHCQ	QIQRQQNLN	DRB4_0101	0.5912	WB
	73	QCEGLRQVRRQQQQ	GLRQVRRQ		0.5368	WB
77	LRQVRRQQQQQGLR	VRRQQQQQ	0.6566		WB	
Ana o 3	68	QNLEQMVRQLQQEQ	LEQMVRQLQ	DRB1_0802	0.5037	WB
	24	QQRFRNCQRYVKQEV	FRNCQRYVK	DRB1_1101	0.6417	WB
	30	CQRYVKQEVQRGGRY	YVKQEVQR	DRB4_0101	0.5676	WB
	73	MVRQLQQEQIQIGEE	QLQQEQIQI		0.5837	WB
	24	QQRFRNCQRYVKQEV	FRNCQRYVK	DRB5_0101	0.6115	WB
Ses i 1	25	LQGRQFRSCQRYLSQ	QFRSCQRYL	DRB1_0901	0.6156	WB
	28	RQFRSCQRYLSQGRS	CQRYLSQGR	DRB5_0101	0.6100	WB
	103	QQVYQRARDLPRRCN	YQRARDLPR		0.6174	WB

Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 23 ilustra a distribuição dos epítomos preditos classificados como fracos ligantes de acordo com sua afinidade com os alelos, porém, podemos observar também a ocorrência dos alelos DRB1_0101 e DRB1_0701 que não foi possível prever epítomos.

Figura 23 - Número de epítomos de células T classificados como fracos ligantes preditos de acordo com a afinidade dos alérgenos aos 14 tipos de alelos de HLA - DR calculado pelo método de redes neurais NetMHCII (referente ao MHC da classe II).



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota-se que o NetMHC II além da capacidade de gerar as predições dos epítomos de células T, ele calcula os valores de afinidade da ligação de cada epítomo de células T aos diferentes alelos HLA-DR, de MHC II. O programa nos mostra os valores de afinidade de ligação transformada em log50K, ou seja, $1 - \log_{50}k$ (aff nM), o que permite classificar os epítomos em ligantes ou não ligantes, sendo usado o limite 500 nM. Desta forma, os epítomos com valores de afinidade de ligação transformados em log50K maiores que 0,426 foram classificados como epítomos ligantes. Os epítomos também recebem do programa uma classificação de forte (SB) ou fraco ligante (WB).

De posse dos epítomos preditos de células B e T, juntamente com epítomos ligantes de IgE obtidos com dados da literatura, compilamos na tabela 7 destacando informações dos alérgenos abordados neste trabalho.

Tabela 7 – Núcleo de ligação de epítomos de células T, epítomos de células B e epítomos ligantes de IgE de alérgenos de pistache (Pis v 1), gergelim (Ses i 1), castanha de caju (Ana o 3).

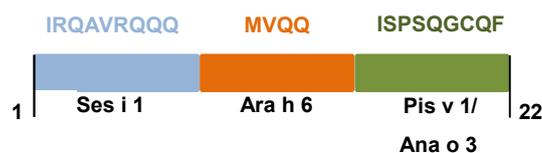
Alérgeno	Núcleo de ligação de epítomos de células T	Epítomos de células B	Epítomos ligantes de IgE
Pis v 1	ISPSQGCQF	EGENLSSGGQSCQKQFEEQQKFKH	QRQQCFKQCCQELQEVDKKCRCQNLE (BARRE <i>et al.</i> , 2021)
	MYVQQEVQK	QQEVQKSQDG	KLQELYETASELPRM (BARRE <i>et al.</i> , 2021)
	-	NQRQQ	SGQSCQKQFEEQQKFKHCQMY (BARRE <i>et al.</i> , 2021)
	-	KRQQQQGQFRGEKLQELYE	CCQELQEVDKKCRCQNLEQM (BARRE <i>et al.</i> , 2021)
Ana o 3	ISPSQGCQF	GEEDEVLEMSTGNQQSEQ	SGREQSCQRQFE (ROBOTHAM <i>et al.</i> , 2005)
	MVRQLQQQE	QQQQEGGYQEGQSQQVYQRARDLPRRC NMRP	KQEVQRGGRYNQ (ROBOTHAM <i>et al.</i> , 2005)
	-	-	SLRECCQELQEV (ROBOTHAM <i>et al.</i> , 2005)
	-	-	QEQIKGEEVREL (ROBOTHAM <i>et al.</i> , 2005)
Ses i 1	IRQAVRQQQ	AIDDEANQQSQQ	GQFEHFRECCNELRDVKSHRCCEALR (DRESKIN <i>et al.</i> , 2021)
	FRSCQRYLS	GEEDEVLEMSTGNQQSEQ	-
	AIRQAVRQQ	QQQQEGGYQEGQSQQVYQRARDLPRRC NMRP	-
	AVRQQQEG	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

5.7. Síntese do peptídeo híbrido de células T

Baseado nas predições de epítomos, o peptídeo híbrido “**IRQAVRQQQMVQQISPSQGCQF**” foi projetado considerando a imunodominância e a alergenicidade das regiões dos alérgenos Ses i 1, Ara h 6, Pis v 1 e Ana o 3 (figura 24).

Figura 24 - Diagrama esquemático do peptídeo híbrido de células T composto por regiões imunogênicas dos alérgenos de gergelim (Ses i 1), amendoim (Ara h 6), pistache (Pis v 1) e castanha de caju (Ana o 3).



Fonte: Elaborado pela autora.

O peptídeo híbrido foi sintetizado comercialmente no fabricante *GenScript* após passar pelas análises de avaliação das propriedades físico-químicas, predição e determinação da estrutura secundária e predição da antigenicidade. Após a síntese, o peptídeo híbrido teve sua sequência e homogeneidade analisada por espectrometria de massas, obtendo-se uma pureza maior que 85%, conforme informado pelo fabricante.

5.8. Avaliação das propriedades físico-químicas do peptídeo híbrido de células T

O reconhecimento do antígeno pelo anticorpo ocorre através de ligação não covalente não reversível, ou seja, para manter unido o complexo antígeno-anticorpo, conta-se com a participação de forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. Sabe-se que a especificidade da interação antígeno-anticorpo é alta, e ela pode ser influenciada pelas características físico-químicas do sítio de ligação e dos epítomos presentes no antígeno (MURPHY *et al.*, 2010).

Para avaliar as características físico-químicas do peptídeo híbrido de células T, submetemos sua sequência proteica à análise pelo programa *ProtParam* e foram obtidas as seguintes informações conforme tabela 8:

Tabela 8 – Características físico-químicas do peptídeo híbrido de células T obtidas *in silico* pelo programa *ProtParam*. (kDa = kilodaltons).

Características	IRQAVRQQQM VQQISPSQGCQF
Número de aminoácidos	22
Massa molecular	2560.93
Ponto isoelétrico teórico	10.35
Nº total de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu)	0
Nº total de resíduos carregados positivamente (Arg +Lys)	2
Índice de Instabilidade	83.95 (instável)
Índice alifático	66.36

Fonte: Elaborada pela autora.

Podemos constatar que o peptídeo híbrido de células T (IRQAVRQQQM VQQISPSQGCQF) é composto por: 2 isoleucinas (**I**) resíduos alifáticos, apolares e hidrofóbicos; 2 argininas (**R**), resíduos carregados positivamente; 8 glutaminas (**Q**) resíduos polares, não carregados hidrofílicos; 1 alanina (**A**), resíduo

alifático, apolar e hidrofóbico; 2 valinas (**V**) resíduos alifáticos, apolares e hidrofóbicos; 1 metionina (**M**) resíduo alifático, apolar e hidrofóbico; 2 serinas (**S**) resíduos polares, não carregados hidrofílicos; 1 prolina (**P**), resíduo apolar e hidrofóbico; 1 glicina (**G**) resíduo polar, não carregado e hidrofílico; 1 cisteína (**C**) resíduo polar, não carregado e hidrofílico; 1 fenilalanina (**F**) resíduo aromático apolar e hidrofóbico.

Já foi descrito que no sítio de ligação dos anticorpos com os antígenos são encontrados muitos resíduos de aminoácidos aromáticos, os quais estão envolvidos em interações através de forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e até mesmo por pontes de hidrogênio. Aminoácidos como a tirosina participa de interações hidrofóbicas como também por pontes de hidrogênio, e normalmente ela é encontrada no sítio de interação antígeno-anticorpo. Aminoácidos com cadeias laterais carregadas são mais susceptíveis a interações eletrostáticas entre suas cadeias laterais e pontes de hidrogênio. Isso ocorre com a arginina, destacando também sua presença na interação do antígeno-anticorpo, contribuindo com uma forte ligação (MURPHY *et al.*, 2010).

5.9. Predição e determinação da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T

Para o peptídeo híbrido de células T foram preditas estruturas secundárias com cerca de 56% em α -hélices e 39% do tipo randômica, conforme mostrado na figura 25.

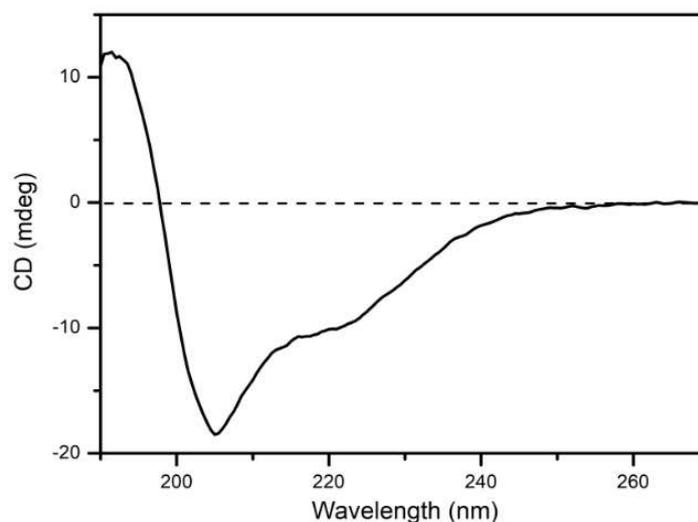
Figura 25 - Predição da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T através do software PHD.

IRQAVRQQMVQQISPSQGCQF			
10	20		
IRQAVRQQMVQQISPSQGCQF			
ChHHHHhHHHHhhCCCCCcC			
Sequence length : 22			
SIMPAA96 :			
Alpha helix (Hh) :	13 is	56.52%	
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%	
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%	
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%	
Extended strand (Ee) :	0 is	0.00%	
Beta turn (Tt) :	0 is	0.00%	
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%	
Random coil (Cc) :	9 is	39.13%	
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%	
Other states :	1 is	4.35%	

Fonte: Elaborado pela autora.

A estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T determinada por difração de raios X é mostrada na figura 26.

Figura 26 - Determinação da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T por espectrometria de dicroísmo circular.



Fonte: Elaborado pela autora, com dados obtidos do equipamento Jasco Corporation.

A análise do espectro de dicroísmo circular revela uma combinação de estruturas alfa helicoidais (caracterizadas por picos negativos em torno de 222 nm e 208 nm), que são estruturas predominantes para proteínas albuminas 2S, e de estruturas secundárias não ordenadas (pico negativo em torno de 200 nm), confirmando assim os dados de predição.

5.10. Predição da antigenicidade do peptídeo híbrido de epítomos de células T

Sabemos que para um peptídeo ser considerado um candidato a possíveis vacinas, é necessário que ele possua um potencial imunogênico, ou seja, capacidade de induzir uma resposta imune protetora.

De posse da sequência de aminoácidos do peptídeo híbrido foi possível através do software *ANTIGENpro* avaliar o potencial antigênico, que apresenta valor limite de predição igual a 0,4. Ao submeter a sequência do peptídeo híbrido ao programa *ANTIGENpro* podemos verificar que o peptídeo apresenta baixo potencial de antigenicidade, como demonstrado na tabela 9.

Tabela 9 - Verificação do grau de antigenicidade do peptídeo híbrido no software *ANTIGENpro*.

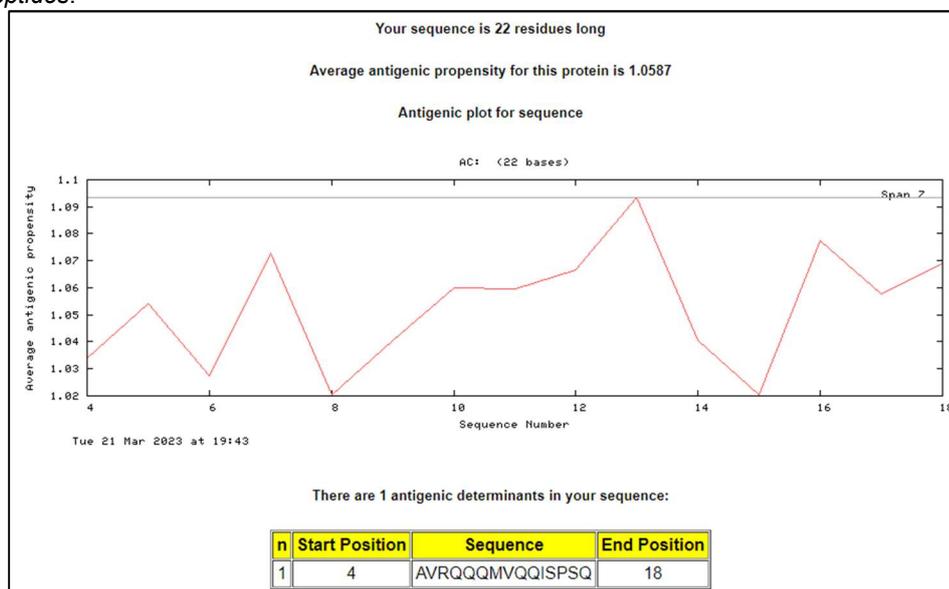
Peptídeo híbrido	Predicted Probability of Antigenicity
IRQAVRQQQMVMVQQISPSQGCQF	0.118593

Fonte: Elaborado pela autora.

Em seguida, avaliamos também a antigenicidade pelo programa *Predicted Antigenic Peptides*, a fim de avaliar qual segmento dentro da sequência do peptídeo

híbrido estava mais relacionado com o potencial antigênico, ou seja, de estimular a síntese de anticorpos.

Figura 27 - Previsão de antigenicidade para o peptídeo híbrido de células T obtido pelo software *Predicted Antigenic Peptides*.



Fonte: Elaborado pela autora, com dados obtidos pelo software *Predicted Antigenic Peptides*.

Podemos observar na figura 27 na previsão de antigenicidade pelo software *Predicted Antigenic Peptides* que o peptídeo híbrido possui um fragmento na sequência na posição 4 - 18 que apresenta uma tendência de ação antigênica.

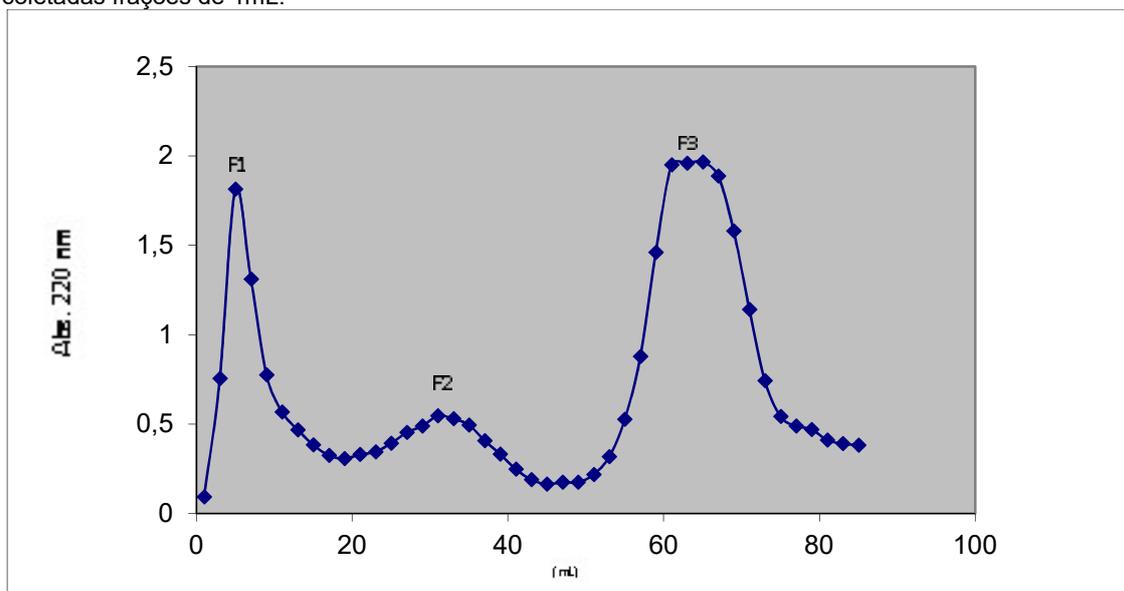
5.11. ETAPA II - Caracterização dos alérgenos

5.12. Extração, purificação e caracterização de albumina 2S das oleaginosas

5.12.1. Separação das frações proteicas por cromatografia líquida de exclusão molecular

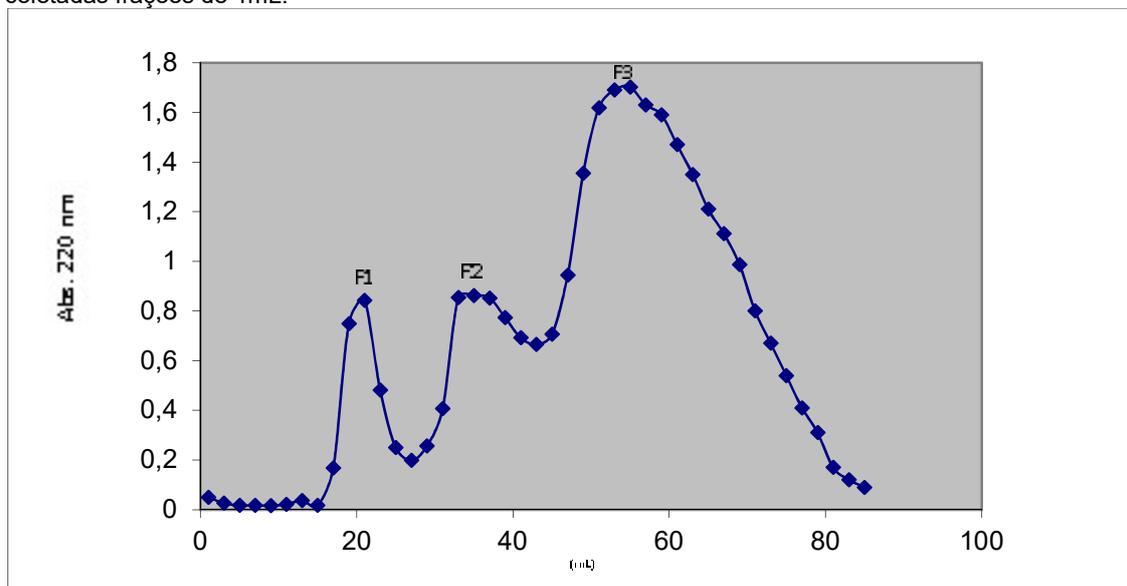
O perfil cromatográfico para o extrato bruto obtido das sementes de amendoim e gergelim apresentou três picos representados abaixo (Figuras 28 e 29). As frações foram denominadas: F1- fração de massa molecular superior a 30.000 Dalton; fração F2 com massa molecular entre 10.000 e 30.000 Dalton; F3 fração de massa molecular menor que 10.000.

Figura 28 - Perfil cromatográfico da cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G50) do extrato bruto de sementes de amendoim. Eluente utilizado Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,1%, fluxo 1 mL/min e coletadas frações de 1mL.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 29 - Perfil cromatográfico da cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G50) do extrato bruto de sementes de gergelim. Eluente utilizado Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,1%, fluxo 1 mL/min e coletadas frações de 1mL.



Fonte: Elaborado pela autora.

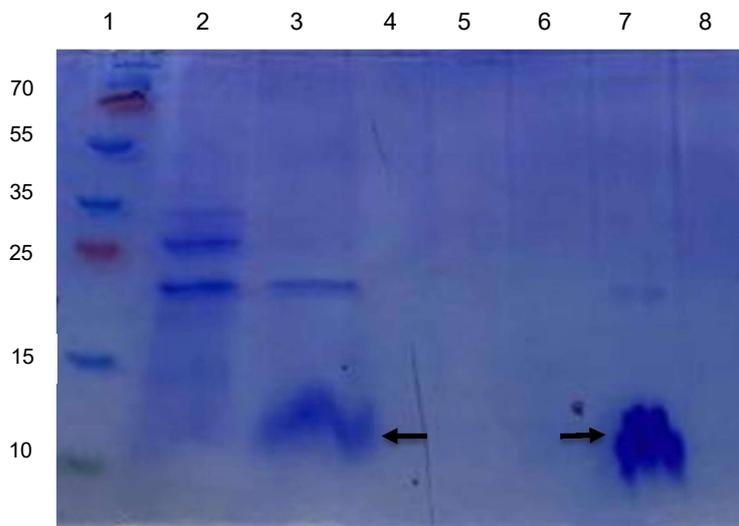
As frações F2 de ambas as sementes são as regiões previstas com os perfis cromatográficos das proteínas albuminas 2S, que apresentam massas moleculares próximas de 12 KDa.

5.12.2. Eletroforese SDS-PAGE

A homogeneidade das frações obtidas após a cromatografia líquida de exclusão molecular foi analisada por SDS-PAGE. A análise eletroforética do gel de poliacrilamida 15% permitiu-nos observar o perfil proteico das frações de gergelim e amendoim.

As frações F2 de gergelim e amendoim que correspondem à albumina 2S apresentaram massas moleculares próximas de 12 kDa estão destacadas pela seta, conforme ilustrado na figura 30. As bandas visualizadas próximo a 24 kDa correspondem aos dímeros formados e previstos para as albuminas 2S.

Figura 30 - Perfil proteico das frações de gergelim e amendoim. 1) marcador de massa molecular; 2) F1 – fração de massa molecular alta de amendoim; 3) F2 – fração de massa molecular intermediária de amendoim; 4) F3 – fração de massa molecular baixa de amendoim; 5) tampão de amostra; 6) F1 – fração de massa molecular alta de gergelim; 7) F2 – fração de massa molecular intermediária de gergelim; 8) F3 – fração de massa molecular baixa de gergelim.

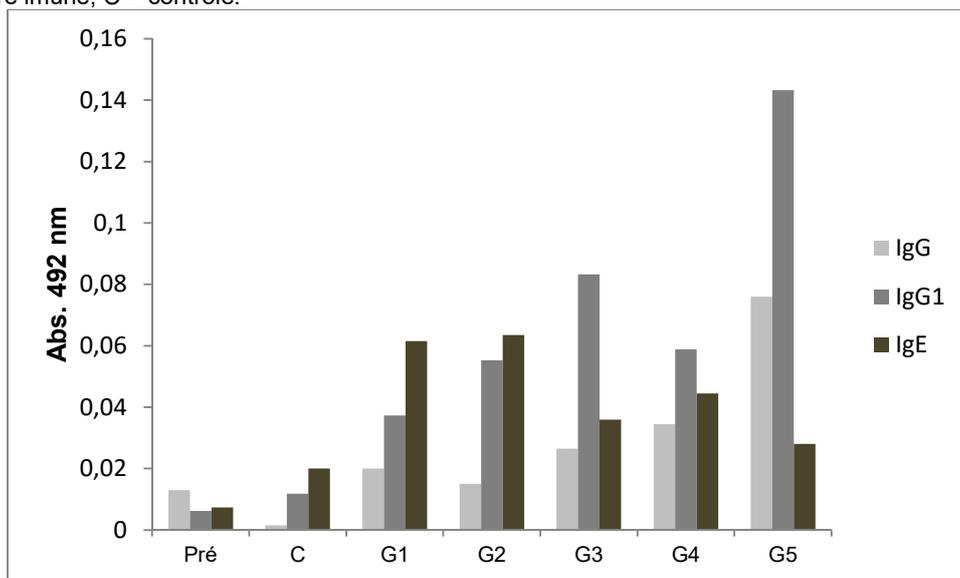


Fonte: Elaborado pela autora.

5.12.3. Níveis séricos de imunoglobulinas de animais sensibilizados com alérgenos de gergelim e amendoim

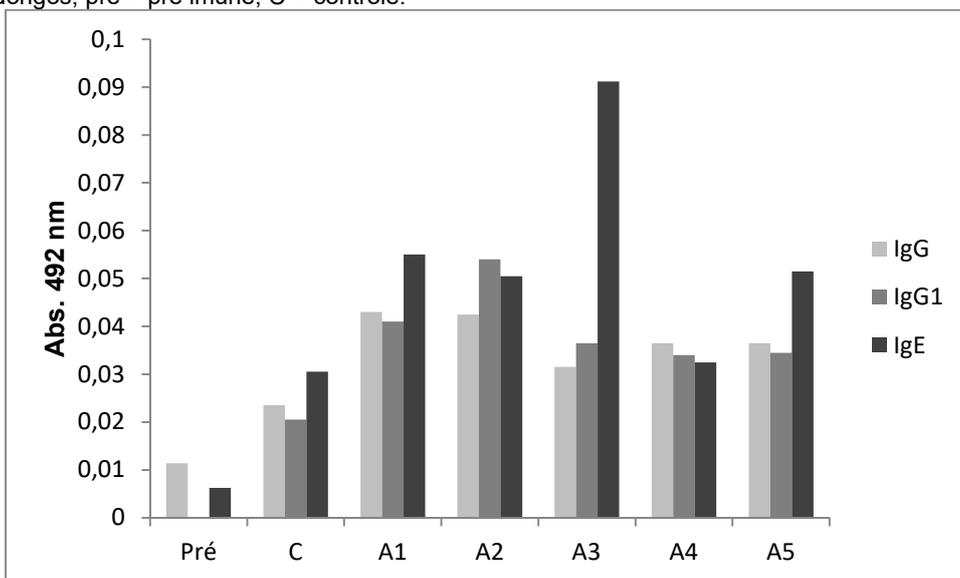
Os resultados do estímulo humoral nos camundongos sensibilizados com gergelim (G1 a G5) pode ser visualizado na figura 31, e dos camundongos sensibilizados com amendoim (A1 a A5) na figura 32.

Figura 31 – Produção de IgG, IgG1 e IgE específica anti-albumina 2S de gergelim obtidos nos soros de camundongos sensibilizados com 50 µg de albumina 2S de gergelim. G1, G2, G3, G4 e G5 = camundongos; pré = pré imune; C = controle.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 32 – Produção de IgG, IgG1 e IgE específica anti-albumina 2S de amendoim obtidos nos soros de camundongos sensibilizados com 50 µg de albumina 2S de amendoim. A1, A2, A3, A4 e A5 = camundongos; pré = pré imune; C = controle.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para todos os camundongos observamos, além da produção de IgG, o aumento nos níveis de IgG1 e IgE confirmando um perfil de resposta Th2 nestes animais desencadeado pelas albuminas 2S de amendoim e de gergelim.

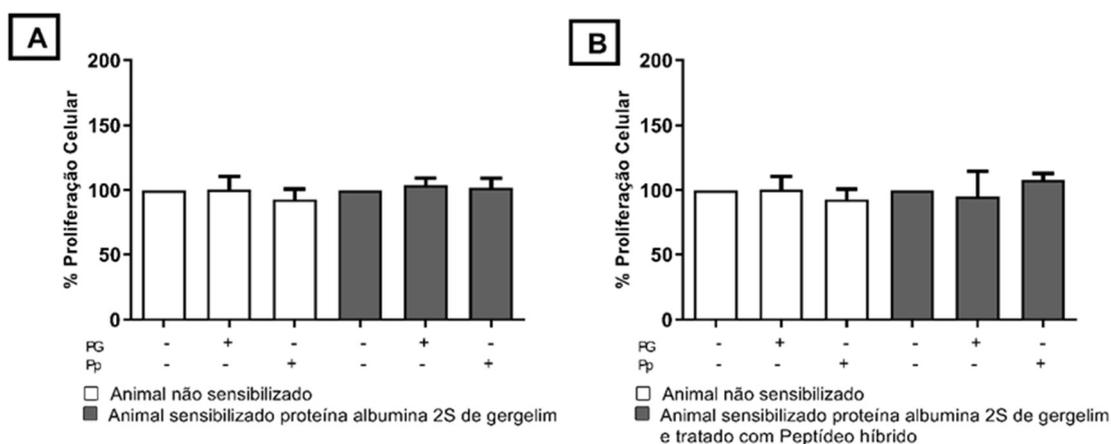
5.13. Investigação dos epítomos de células T

Após o término das imunizações, os animais foram eutanasiados, os baços foram retirados assepticamente e os esplenócitos cultivados *in vitro* na presença ou não de proteínas albuminas 2S de gergelim (PG) e de amendoim (PA), e com o peptídeo híbrido de células T (Pp) para avaliação quanto a capacidade proliferativa de células e de produção de citocinas. Além disso, para avaliação do tratamento *in vivo* com peptídeo híbrido, camundongos que receberam a imunização citada acima, receberam quatro doses do tratamento contendo 200 µg de peptídeo híbrido de células T na presença do adjuvante hidróxido de alumínio por via intraperitoneal. Após sete dias do último tratamento, os camundongos receberam uma dose desafio de 100 µg de albumina 2S de amendoim ou gergelim.

5.13.1. Avaliação da proliferação dos esplenócitos

Após o período de incubação por 72 horas à 37°C, as células em cultura foram avaliadas quanto a atividade proliferativa frente aos diferentes estímulos. Podemos observar na figura 33 - **A** as respostas proliferativas das células de animais sensibilizados ou não com PG *in vivo* e após os estímulos recebidos *in vitro*. Não houve uma proliferação de células estatisticamente significativa quando os animais sensibilizados com PG *in vivo* foram estimulados com PG em relação aos animais não sensibilizados e estimulados com PG.

Figura 33 – Resposta proliferativa das células do baço às proteínas albuminas 2S de gergelim (PG) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp). **A**) Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PG *in vivo*. **B**) Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PG e tratados com Pp *in vivo*. As respostas proliferativas, avaliadas pelo método MTT, são indicadas como porcentagem em comparação às células não estimuladas *in vitro*. Os dados são representados como média mais desvio padrão.

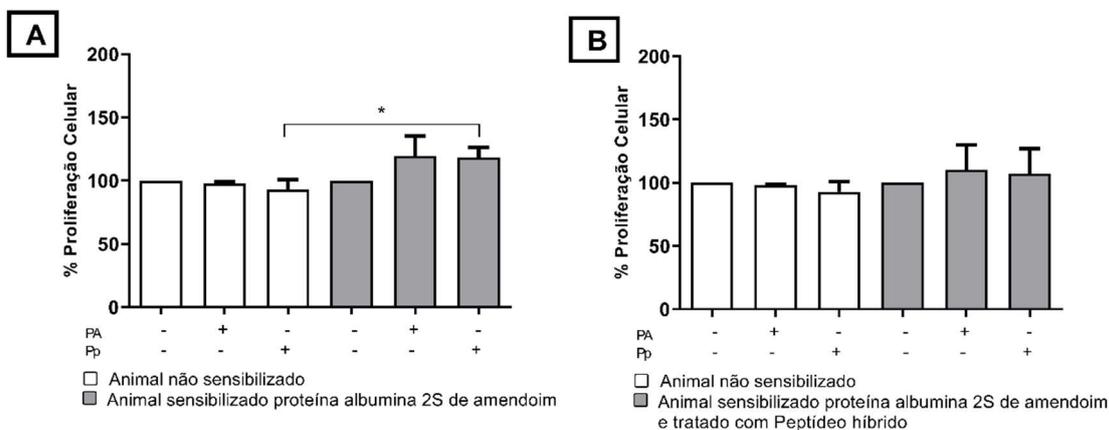


Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 33 - **B** nos mostra a resposta proliferativa das células dos animais não sensibilizados com PG, sensibilizados com PG e tratados com Pp *in vivo*, e após receberem os estímulos com PG e Pp *in vitro*. Semelhante a figura A, em **B** não foi possível observar uma proliferação celular estatisticamente significativa dos animais sensibilizados com PG, tratados com Pp e estimulados com o Pp.

Na figura 34 - **A** observamos uma resposta proliferativa celular maior quando os animais foram sensibilizados com a PA *in vivo*. Quando os animais sensibilizados com PA foram estimulados *in vitro* com o peptídeo híbrido apresentou maior proliferação quando comparado com os animais não sensibilizados e estimulados com o peptídeo híbrido ($p = 0,0295$). Observamos também uma maior proliferação celular nos animais sensibilizados com PA e estimulados com PA em comparação com os animais não sensibilizados e estimulados com PA. Em **B**, foi possível avaliar uma discreta resposta proliferativa das células dos animais não sensibilizados com PA, sensibilizados com PA e tratados com Pp *in vivo*, e após receberem os estímulos *in vitro* com PA e Pp, porém, essa resposta não foi estatisticamente significativa.

Figura 34 – Resposta proliferativa das células do baço às proteínas albuminas 2S de amendoim (PA) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp). **A**) Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PA *in vivo*. **B**) Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PA e tratados com Pp. As respostas proliferativas, avaliadas pelo método MTT, são indicadas como porcentagem em comparação às células não estimuladas *in vitro*. Os dados são representados como média mais desvio padrão.



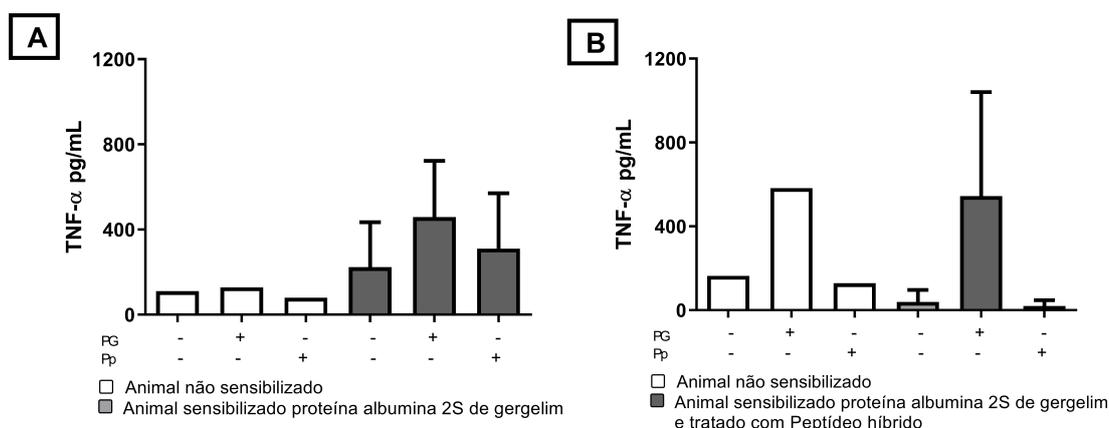
Fonte: Elaborado pela autora.

5.13.2. Avaliação da produção de citocinas das células do baço

Após a incubação de 72 horas, os sobrenadantes da cultura celular foram coletados para avaliar o padrão de resposta Th1/Th2, através da quantificação das citocinas IL-2, INF γ , TNF- α , IL-4 e IL-5. As dosagens das citocinas IL2, IL4 e IL5 foram inconclusivas para os tratamentos realizados *in vitro*.

Na figura 35 - **A** observamos um aumento na produção de TNF- α pelas células do baço sensibilizadas *in vivo* e estimuladas com as proteínas de gergelim (PG) *in vitro*, porém, essa resposta não foi estatisticamente significativa. Em **B**, quando os animais receberam o peptídeo híbrido (Pp) como tratamento *in vivo* e foram estimulados com PG os níveis de TNF- α se aproximaram dos valores dos animais não sensibilizados e estimulados com PG.

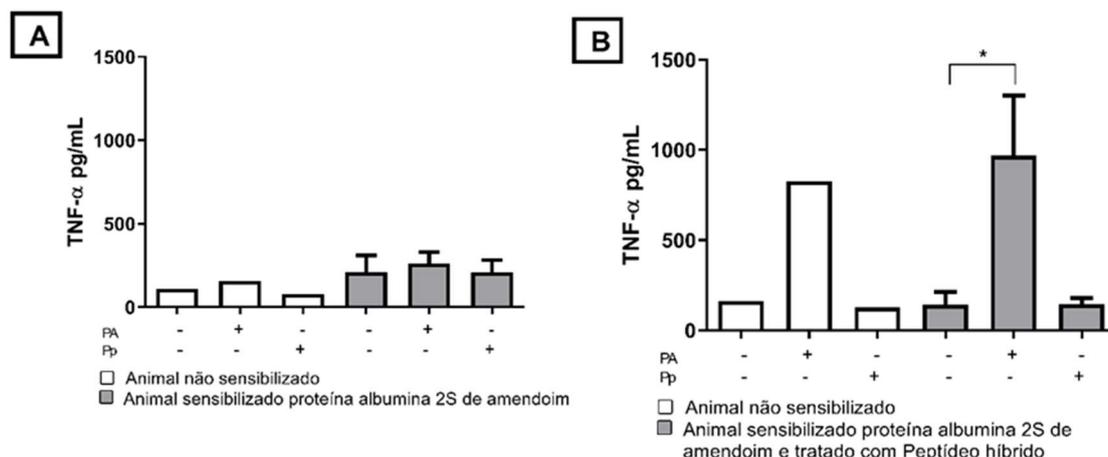
Figura 35 – Produção de TNF- α das células do baço estimuladas às proteínas albuminas 2S de gergelim (PG) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp). **A**) Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PG *in vivo*. **B**) Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PG e tratados com Pp *in vivo*. Os dados são representados como média mais desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 36, observamos em **A** uma maior produção de TNF- α pelas células do baço sensibilizadas e estimuladas com as proteínas de amendoim (PA), porém, essa produção não foi estatisticamente significativa. Em **B**, observamos no grupo dos animais sensibilizados com PA e tratados com Pp uma produção maior de TNF- α quando os animais foram estimulados com a proteína em relação aos animais não estimulados *in vitro* ($p = 0,0496$).

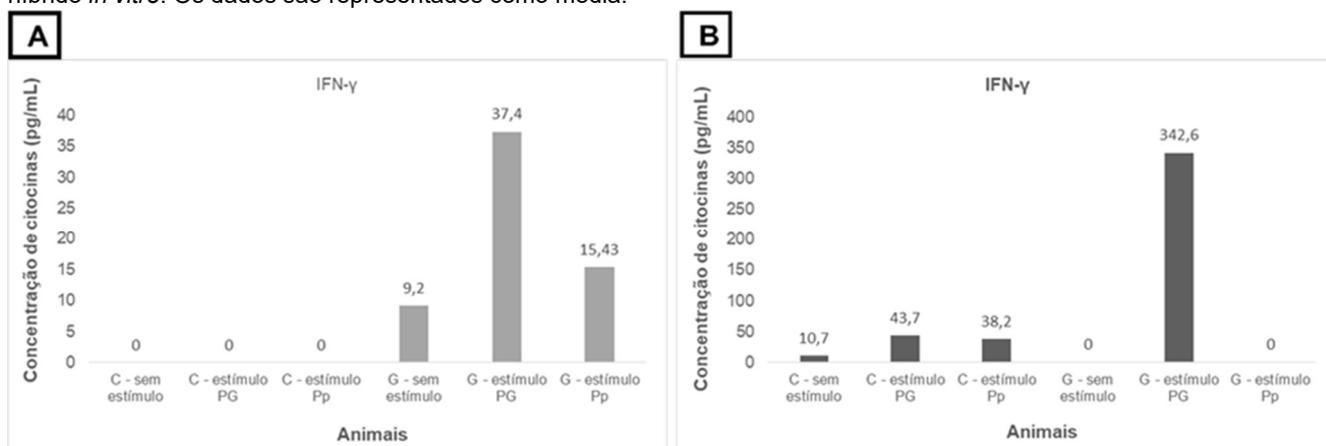
Figura 36 – Produção de TNF- α das células do baço estimuladas às proteínas albuminas 2S de amendoim (PA) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp). **A)** Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PA *in vivo*. **B)** Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PA e tratados com Pp *in vivo*. Os dados são representados como média mais desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora.

Interferon gama é um marcador clássico de resposta Th1. A figura 37 evidencia a produção desta citocina para os camundongos sensibilizados *in vivo* e estimulados com a proteína de gergelim (PG) *in vitro*, apresentando a concentração de IFN- γ de 37,4 pg/mL, e os animais estimulados com o peptídeo híbrido (Pp) a produção de IFN- γ foi de 15,43 pg/mL (Figura 37-A). Quando os animais tratados com o peptídeo híbrido *in vivo* foram estimulados com a proteína de gergelim houve uma maior produção de IFN- γ , tendo atingido a concentração de 342,6 pg/ml para o estímulo *in vitro* com PG (Figura 37-B).

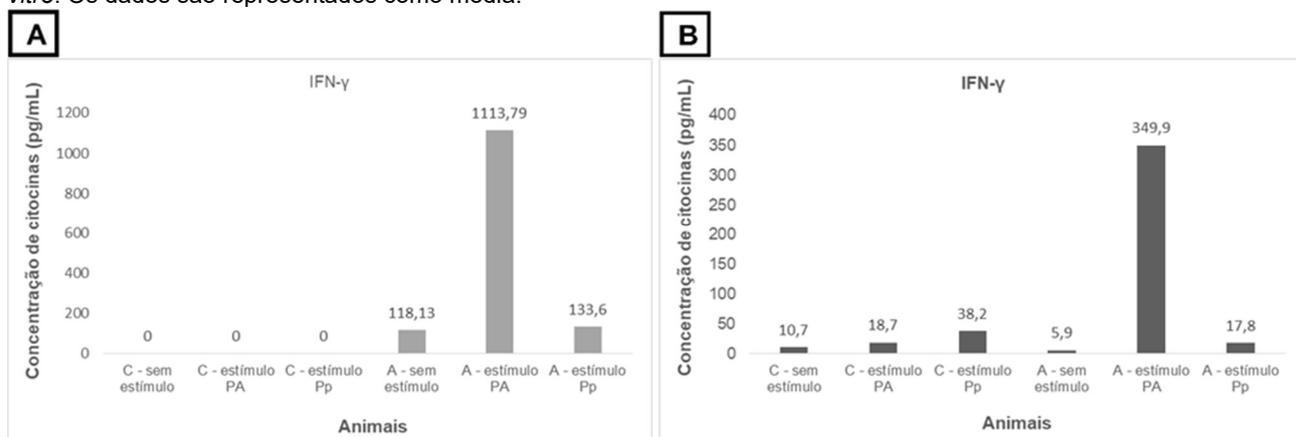
Figura 37 – Produção de INF- γ das células do baço estimuladas às proteínas albuminas 2S de gergelim (PG) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp). **A)** Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PG *in vivo*. **B)** Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PG e tratados com Pp *in vivo*. **C** – Corresponde aos animais do grupo controle não sensibilizados PG *in vivo*; **G** - corresponde aos animais sensibilizados PG *in vivo*; **sem estímulo**: animal não recebeu estímulo *in vitro*; **estímulo PG**: animal recebeu estímulo com proteína de gergelim *in vitro*; **estímulo Pp**: animal recebeu estímulo do peptídeo híbrido *in vitro*. Os dados são representados como média.



Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 38 demonstra em **A**, a produção de IFN- γ para os camundongos sensibilizados *in vivo* e estimulados com a proteína de amendoim (PA) *in vitro*. Quando os animais foram estimulados com a PA houve uma alta produção de IFN- γ (1113,79 pg/mL), e os estímulos com o peptídeo híbrido (Pp) induziram uma produção IFN- γ de 136,6 pg/mL. Já para os animais tratados com o peptídeo híbrido *in vivo*, uma maior produção de IFN- γ pode ser visualizada quando os animais receberam estímulos com a proteína de amendoim.

Figura 38 - Produção de IFN- γ das células do baço estimuladas às proteínas albuminas 2S de amendoim (PA) e ao peptídeo híbrido de células T (Pp). **A**) Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PA *in vivo*. **B**) Animais não sensibilizados e animais sensibilizados com PA e tratados com Pp *in vivo*. **C** – Corresponde aos animais do grupo controle não sensibilizados PA *in vivo*; **G** - corresponde aos animais sensibilizados PA *in vivo*; **sem estímulo**: animal não recebeu estímulo *in vitro*; **estímulo PA**: animal recebeu estímulo com proteína de amendoim *in vitro*; **estímulo Pp**: animal recebeu estímulo do peptídeo híbrido *in vitro*. Os dados são representados como média.

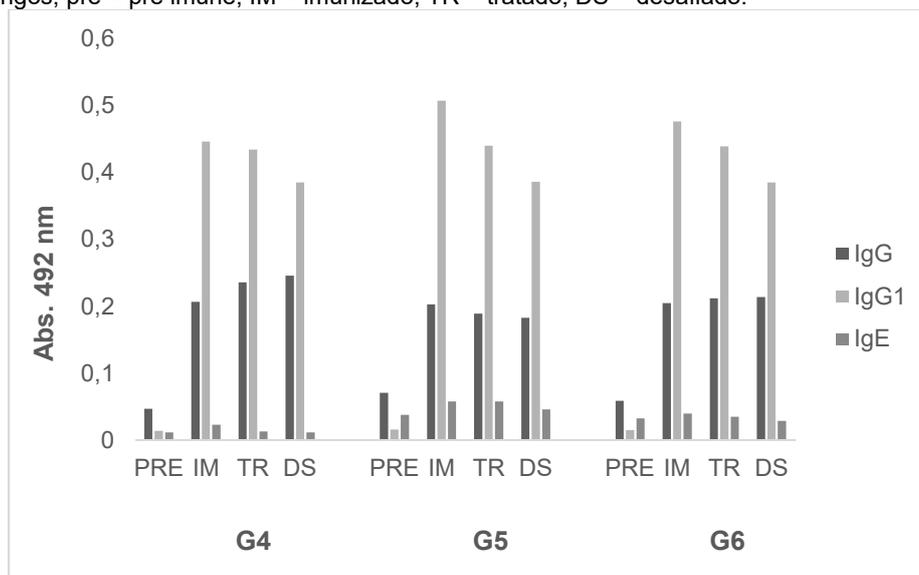


Fonte: Elaborado pela autora.

5.14. Tratamento com o peptídeo híbrido de células T

Para avaliar o tratamento *in vivo* com o peptídeo híbrido de células T, os camundongos previamente imunizados com as proteínas de gergelim e amendoim receberam cinco doses do tratamento com o peptídeo híbrido de células T na presença do adjuvante hidróxido de alumínio, e após sete dias do último tratamento, foram desafiados com uma dose das proteínas. Neste tratamento, a redução não foi significativa nos níveis de IgG1 e IgE nos animais G4, G5 e G6 quando comparado às imunizações (IM) com proteínas de gergelim, tratamentos (TR) e os desafios realizados após o tratamento, conforme demonstrado na figura 39.

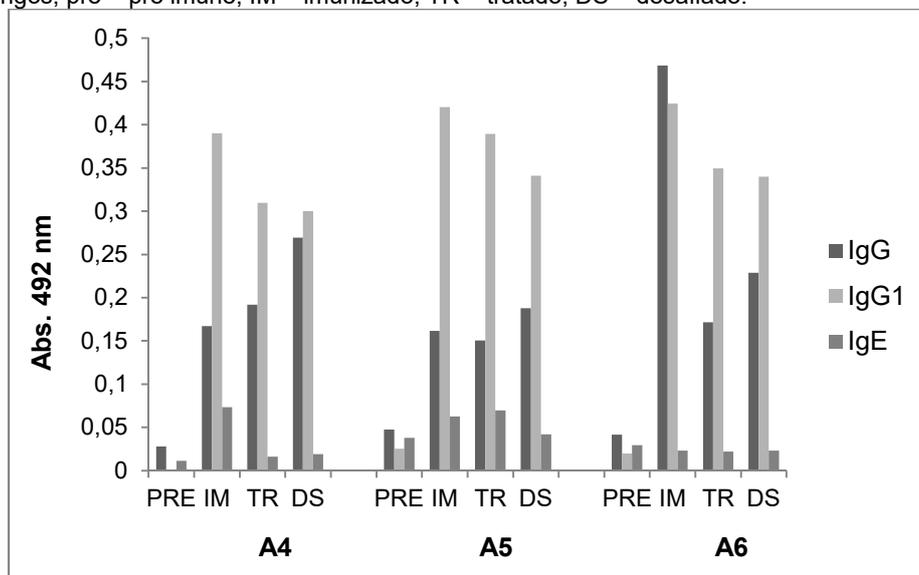
Figura 39 – Comparação da produção de IgG, IgG1 e IgE específica anti-albumina 2S de gergelim obtidos nos soros de camundongos sensibilizados com 40 µg de albumina 2S de gergelim. G4, G5 e G6= camundongos; pré = pré imune; IM = imunizado; TR = tratado; DS = desafiado.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para o amendoim, a produção de IgG, IgG1 e IgE foi observada nos animais A4, A5 e A6 conforme demonstrado na figura 40. Os resultados mostram uma redução nos níveis de IgG1 e IgE, semelhante ao que foi demonstrado para o gergelim.

Figura 40 – Comparação da produção de IgG, IgG1 e IgE específica anti-albumina 2S de amendoim obtidos nos soros de camundongos sensibilizados com 40 µg de albumina 2S de gergelim. A4, A5 e A6 = camundongos; pré = pré imune; IM = imunizado; TR = tratado; DS = desafiado.



Fonte: Elaborado pela autora.

6. Discussão

Os alérgenos presentes nas castanhas e oleaginosas constituem um dos mais importantes desencadeadores de alergias alimentares mediadas por IgE, que afeta milhares de indivíduos alérgicos pelo mundo. Desta forma, a compreensão dos epítomos dos alérgenos é um requisito imprescindível para avaliar como que ocorre as interações entre o antígeno e o anticorpo. Para isso, torna-se necessário o emprego de diversas técnicas como cristalografia de raio-x, sobreposição de peptídeos sintéticos, mutação no sítio de interação do epítomo com anticorpo dentre outras, porém, são técnicas que requerem mais tempo e experimentos de bancada (SHARMA; GAUR; ARORA, 2013).

Sabemos que algumas proteínas são sintetizadas em determinados compartimentos das células, mas, as suas funções biológicas podem ser executadas em outros locais, o que requer que elas sejam direcionadas para o local correto de atuação, papel esse realizado pelo peptídeo sinal. O peptídeo sinal presente em uma proteína é composto de 15 a 60 resíduos de aminoácidos, que normalmente estão dispostos na região N-terminal. Em estudos *in silico* é de grande relevância avaliar a presença de peptídeo sinal, pois isso gera informações mais confiáveis, visto que essa sequência deve ser retirada da proteína de modo a não gerar resultados errôneos impactando nas análises futuras (DE OLIVEIRA LOPES *et al.*, 2013).

Ao prever o peptídeo sinal nos é mostrado o local onde a proteína foi clivada através da modificação pós-tradução. Esse é um dado importante na seleção das proteínas alvos para possíveis tratamentos, pois essas sequências que fazem parte do peptídeo sinal devem ser descartadas, já que elas não fazem parte da proteína final madura (BLECHA *et al.*, 2018). Neste estudo *in silico*, os alérgenos Ara h 2, Pis v 1, Cor a 14, Jug r 1, Ana o 3 e Ses i 1 apresentaram o peptídeo sinal que foram removidos para análises posteriores. Somente os alérgenos Ara h 6 e Ber e 1 não possuíam peptídeo sinal nas suas sequências. Resultado semelhante ao do nosso trabalho foi mostrado numa pesquisa que utilizou programas de bioinformática para identificação de epítomos de *Schistosoma mansoni* com potencial imunogênico. Os autores reforçam a importância da predição de peptídeo sinal durante as análises que visam a identificação de epítomos (ZHANG *et al.*, 2014).

De posse das sequências proteicas dos alérgenos, realizamos o alinhamento múltiplo através do Clustal Ômega. O Clustal Ômega é um programa que consiste no método progressivo de alinhamento baseado na criação de uma árvore guia, que tem o objetivo de guiar o alinhamento, e na utilização do algoritmo *mBed*, o que permite o processamento de muitos dados. Isso o difere das versões anteriores, visto que a

criação de árvores filogenéticas é uma etapa que requer mais trabalho, sendo calculada pelas distâncias pareadas das sequências. Para melhorar o refinamento do alinhamento, o programa sofreu algumas melhorias como a utilização do algoritmo *HHalign*, que é um alinhador perfil-perfil, que permite as sequências serem alinhadas em maiores grupos (SIEVERS; HIGGINS, 2014).

Através do alinhamento múltiplo pudemos observar a presença de regiões conservadas entre os alérgenos. Destacamos também que os resíduos de cisteínas se alinharam, bem como a presença nas sequências de aminoácidos ácido glutâmico, um resíduo importante para a interação com a IgE. Todas essas informações e o padrão de regiões conservadas contribuem para a seleção e síntese de peptídeos alvos para criação de uma possível terapia para o tratamento de alergias.

A partir do alinhamento foi construída a árvore filogenética, através do método *Neighbor-joining* sem correções de distância. O estudo da árvore filogenética iniciou desde a época de Charles Darwin, no século 19, e se estende até hoje por pesquisadores. A árvore filogenética nos permite compreender a evolução e as transições das espécies, e como elas estão relacionadas entre si (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020). Pudemos visualizar através da construção da árvore filogenética que entre os oito alérgenos do nosso trabalho existem relações de ancestralidades, o que confirma as similaridades entre eles.

Estudar as características físico-químicas dos alérgenos nos permite entender melhor como ocorre a interação antígeno-anticorpo e quais os fatores que podem impactar nessa interação. Através do programa *ProtParam*, avaliamos as seguintes características físico-químicas: número de aminoácidos, massa molecular, ponto isoelétrico, nº de resíduos carregados positivamente e negativamente, índice de estabilidade e índice alifático. Para os oito alérgenos estudados, observamos que são compostos por 114 a 160 resíduos de aminoácidos e apresentam baixa massa molecular (14 a 19 kDa).

O ponto isoelétrico (pI) corresponde ao valor de pH em que uma proteína apresenta sua carga líquida igual a zero, ou seja, eletricamente neutra. Através da relação do pH e do pI, torna-se possível reconhecer a carga líquida da proteína, visto que, quando o pH for menor que o pI apresentará carga líquida positiva, e quando o pH for maior que o pI a carga líquida será negativa (PIHLASALO *et al.*, 2012). Desta forma, em pH fisiológico (pH = 7) é esperado que proteínas com pI acima de 7, apresentem carga elétrica líquida positiva. Neste estudo, somente os alérgenos Pis v 1 e Ses i 1 foram preditos com carga elétrica líquida positiva, ou seja, indicam uma natureza básica. Já os alérgenos Ara h 6, Ara h 2, Ber e 1, Cor a 14, Jug r 1 e Ana o 3 indicam uma natureza ácida.

O Ara h 2 foi o alérgeno que apresentou mais resíduos carregados negativamente (Asp + Glu), e em contrapartida, o Pis v 1 apresentou menos resíduos. Quanto ao número de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys), o Ara h 2 apresentou mais resíduos e o Ara h 6 e Jug r 1 apresentaram menos resíduos.

Em relação ao índice de instabilidade, já foi descrito que ele se refere a estabilidade de uma proteína em um tubo de ensaio, visto que uma proteína é considerada estável quando apresenta um índice de instabilidade menor que 40 (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990). Todos os oitos alérgenos do nosso estudo foram preditos como instáveis pelo servidor devido ao valor calculado ter sido superior a 40.

O índice alifático de proteínas está relacionado como o volume relativo que as cadeias laterais alifáticas (alanina, valina, isoleucina e leucina) ocupam, sendo um fator importante para o aumento da estabilidade de proteínas globulares (IKAI, 1980). Desta forma, se a proteína apresenta um valor elevado de índice alifático melhor será a sua termoestabilidade. O índice alifático dos oito alérgenos variam de 22.46 para o alérgeno Ber e 1 a 77.89 para o alérgeno Jug r 1. Diante disso, torna-se possível supor que o alérgeno Jug r 1 possui uma razoável estabilidade térmica. O alérgeno Ana o 3 também apresenta essa característica, visto que apresenta o índice alifático de 74.86.

Uma característica importante dos epítomos relacionada a sua parte estrutural e que deve ser levado em conta para diferenciá-lo de fragmentos não-epítomos presentes na superfície do antígeno é a sua composição de estrutura secundária (RUBINSTEIN *et al.*, 2008). Nosso estudo revelou que todos os alérgenos são significativamente enriquecidos com a estrutura do tipo α -hélices (alfa-hélices), apresentando uma maior porcentagem (65,42%) no alérgeno Cor a 14, e uma menor porcentagem em Ara h 2 (45,26%). Outro tipo de estrutura que compõe todos os alérgenos numa proporção mediana foi a do tipo randômica, que variam de 54,74% no alérgeno Ara h 2 e 31,45% no alérgeno Cor a 14. Já a estrutura do tipo fita estendida aparece em proporções mais baixas (12,31% - 4,03%), sendo que a mesma não está presente nos alérgenos Ara h 6, Ara h 2 e Ber e 1. Somente a estrutura de folha beta não foi predita para os oito alérgenos.

A busca por predições de epítomos lineares se baseia na hipótese de que os peptídeos sintéticos derivados dos fragmentos lineares presentes nas proteínas podem ser capazes de induzir a produção de anticorpos contra os peptídeos, que por sua vez reagem de maneira cruzada com o antígeno presente na proteína nativa (QUIJADA *et al.*, 1996). A análise de epítomos lineares conservados é importante para estudos de vacinas compostas por multiepítomos, pois estudos mostram que a incorporação desses epítomos a uma proteína sintética foi capaz de manter a imunorreatividade. Por outro

lado, se epítomos conformacionais fossem utilizados para obter um antígeno sintético, existiria uma probabilidade alta de não conseguirem manter sua integridade conformacional, e conseqüentemente sua imunorreatividade (DIPTI; JAIN; NAVIN, 2006).

Um estudo realizado com finalidade de obter uma molécula candidata para o diagnóstico de *Schistosoma mansoni* também selecionou um epítomo linear que apresentou reconhecimento por IgG em soro de pacientes infectados (DE SOUZA *et al.*, 2018). Outro estudo realizado com *Leishmania chagasi* com a finalidade de identificar novos antígenos utilizou o programa *Bepipred* para a predição de epítomos de células B. Neste trabalho foram identificadas 41 proteínas para epítomos de células B, sendo que o programa resultou em 180 peptídeos preditos, que foram sintetizados e testados com soros de animais, e destes, 25 peptídeos mostraram resultados interessantes para uso em diagnóstico de leishmaniose visceral (COSTA *et al.*, 2011).

El-Manzalawy *et al.*, (2008) utilizaram o programa *BCPred* para prever os epítomos de células B presentes na proteína SARS-CoV S, mais especificamente, presentes na região do domínio de ligação ao receptor (RBD), a fim de bloquear o receptor. Uma busca na literatura foi realizada para levantar os epítomos já identificados para a região RBD, totalizando cinco epítomos. Após a submissão da sequência proteica ao *BCPred*, os autores observaram resultado satisfatório, visto que quatro epítomos preditos foram os mesmos já identificados para a região RBD.

A prática de combinação de programas de predição de epítomos de células B também vem sendo empregada, pois os resultados podem ser comparados, apresentando dados mais precisos e confiáveis. Neste estudo, combinamos três métodos de predição de epítomos de células B: *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0*, *BcePred* e *BCPreds*. Como resultado das predições nos três métodos, obtivemos 204 epítomos de células B preditos para os 8 alérgenos. Após analisar todos os epítomos, foi possível identificar 27 epítomos preditos que foram comuns nos três métodos de predição. Esses resultados mostram que usar mais de um programa de predição pode apresentar resultados melhores do que um único programa. Resultado semelhante foi mostrado por pesquisadores, que utilizaram a combinação de três programas para mapear epítomos de células B de *Leishmania infantum* sendo eles: *ABCPred*, *Bepipred* e *BCPred*. De posse dos epítomos preditos, 360 foram sintetizados para realizar as análises e identificar os mais imunorreativos, destacando 10 peptídeos que foram preditos pelos três programas. Os resultados das predições foram significativos pois, os 10 peptídeos preditos apresentaram excelente taxas de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da doença (FARIA *et al.*, 2011).

Sharma *et al.*, (2013) utilizaram a combinação de quatro programas para identificar epítomos de células B presentes na osmotina, uma proteína alergênica presente na *Nicotiana tabacum*, a fim de avaliar a redução da alergenicidade através de mutações nos resíduos. Os autores observaram que três epítomos de células B preditos nos estudos *in silico* apresentaram boa correlação com os estudos experimentais, e os epítomos modificados apresentaram perfil hipoalergênico.

Diversos trabalhos analisaram as características físico-químicas dos epítomos de células B. Já foram descritos e mostraram que pode haver uma correlação entre os aminoácidos hidrofílicos carregados e o potencial de antigenicidade (HOPP; WOODS, 1981). A partir disso, pesquisadores propuseram diversos parâmetros físico-químicos para avaliar a localização dos epítomos de células B, sugerindo que eles são compostos por aproximadamente 10 a 20 resíduos de aminoácidos (KRINGELUM *et al.*, 2013). Seguindo nesse contexto e de acordo com as predições realizadas neste trabalho, observamos que os epítomos de células B dos oito alérgenos estudados apresentam sequências que variam de 4 a 24 resíduos de aminoácidos.

Murphy *et al.* (2010) descreveram que no sítio de ligação dos anticorpos com os antígenos são encontrados muitos resíduos de aminoácidos aromáticos, os quais estão envolvidos em interações através de forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e até mesmo por pontes de hidrogênio. Outros autores estudaram as propriedades que caracterizassem os epítomos de células B, e demonstraram que, normalmente eles são compostos pelos resíduos de aminoácidos tirosina, triptofano e aminoácidos carregados e polares, o que os permitem formar múltiplas interações. É importante lembrar que os epítomos de células B são de superfície, o que os tornam mais acessíveis, destacando a presença de aminoácidos que apresentam as cadeias laterais expostas, sugerindo a participação desses resíduos na formação do complexo antígeno-anticorpo, o que contribui com essa interação. Em relação a localização, estudos mostram que os epítomos de células B são encontrados em “*loops*”, estruturas aleatórias que se apresentam em formas de voltas, o que os conferem mais flexibilidade favorecendo sua interação com os anticorpos (RUBINSTEIN *et al.*, 2008).

Para a pesquisa de possíveis peptídeos com alvos antigênicos são empregadas análises que calculam a afinidade de sequências proteicas com as moléculas de HLA. Sabe-se que certos antígenos podem ser reconhecidos por distintas moléculas de HLA. Desta forma, ao utilizar esses antígenos contribui com a amplificação de indivíduos que seriam capazes de reconhecê-los, o que implica no aumento da capacidade de estimular o sistema imunológico, visto que as moléculas de HLA das pessoas se modificam devido ao polimorfismo (WIENS *et al.*, 2013).

Abbas *et al.* (2011) descreveram como afinidade do anticorpo a força de ligação de um fragmento do anticorpo a um epítopo, sendo representada pela constante de dissociação (K_d), que demonstra a facilidade da separação da interação antígeno-anticorpo. Para a predição de epítomos de células T nós utilizamos o programa NetMHC II, que é treinado em um amplo conjunto de dados de ligação dos peptídeos a molécula de MHC. O programa foi capaz de gerar valores de afinidade dos peptídeos, que neste trabalho teve a cobertura de 14 moléculas DR do MHC da classe II de humano.

Após o envio das sequências proteicas ao programa NetMHCII obtivemos a predição de um total de 204 epítomos de células T, onde apenas 17 foram classificados como epítomos de forte ligação e 43 epítomos classificados como epítomos de fraca ligação. Os alérgenos de amendoim, Ara h 2 e Ara h 6, não apresentaram nenhum epítopo de forte ligação. Observamos que para os alelos DRB1_0101, DRB1_0301, DRB1_0401, DRB1_0405, DRB1_0701, DRB1_1302, DRB1_1501, DRB3_0101 e DRB5_0101 não foram preditos epítomos de forte ligação, e apenas os alelos DRB1_0101 e DRB1_0701 não houve predições de epítomos de fraca ligação.

Observamos também que os peptídeos foram codificados pelo programa NetMHCII de acordo com o núcleo de ligação dos peptídeos, que normalmente são compostos por nove aminoácidos. Quanto ao restante dos epítomos preditos, 144 foram classificados apenas como ligantes.

Alguns autores mencionaram que existem fatores que podem dificultar na predição dos peptídeos de ligação ao complexo MHC II, como por exemplo o alto grau de polimorfismo da molécula MHC II, o tamanho do peptídeo, a previsão do núcleo de ligação de peptídeos e as regiões de flaqueamento dos peptídeos (JENSEN *et al.*, 2018). Isso pôde ser visto durante a predição de epítomos de células T realizada no programa NetMHC II, pois percebemos que a identificação *in silico* de epítomos de células T demanda um certo trabalho diante da diversidade de epítomos que foram gerados, mas que após uma análise minuciosa nos mostrou a previsão de potenciais peptídeos de ligação à molécula de MHC II presentes nos alérgenos estudados.

Na estratégia de imunoterapia como tratamento da alergia alimentar são utilizados os extratos brutos derivados dos alimentos, o que consiste numa estratégia de fácil manuseio, porém, os efeitos colaterais acontecem na maioria dos casos. Já a imunoterapia que utiliza epítomos presentes nos peptídeos apresenta a vantagem pelo fato de ser altamente específica, e isso contribui para que não ocorra os efeitos colaterais, pois os epítomos utilizados são sintetizados de forma isolada do alérgeno, eliminando assim os fragmentos que poderiam causar efeitos não desejados.

Desta forma, é importante utilizar peptídeos sintéticos como candidatos a futuras vacinas, tendo em vista que são os fragmentos presentes nos epítomos dos alérgenos

que são empregados, o que difere das vacinas tradicionais. Diversos estudos mostraram que as vacinas com peptídeos são consideradas mais seguras, capazes de induzir uma melhor resposta imunológica, além de serem produzidas em escala, com alto grau de pureza e reprodutibilidade (WANG *et al.*, 2003).

A literatura recente apresenta o uso de peptídeos sintéticos como alternativa válida para o tratamento das doenças alérgicas, observando nos imunoenaios a redução dos níveis de IgE e da produção de citocinas inflamatórias que predominam no perfil de resposta Th2. A tabela 7 apresenta um resumo de epítomos de células T, células B e ligantes de IgE para os alérgenos estudados. O peptídeo sintetizado contém regiões epítomos de células T sem sobreposição com epítomos de células B ou ligantes de IgE. A partir disso, através da análise dos dados gerados pelo NetMHCII, construímos uma imunoterapia de peptídeo sintético híbrido baseada em epítomos de células T, objetivando o tratamento de alergias desencadeadas pelo consumo das castanhas. Composta por uma sequência de 22 resíduos de aminoácidos (IRQAVRQQMVQQISPSQGCQF) derivados dos alérgenos amendoim (Ara h 6), gergelim (Ses i 1), pistache (Pis v 1) e castanha de caju (Ana o 3), que passou por análises *in silico* de antigenicidade.

As características físico-químicas do peptídeo híbrido de células T foram avaliadas pelo programa *ProtParam*, que nos apontou as informações: apresenta uma massa molecular de 2560.93 kDa; carga elétrica líquida positiva, o que nos indica uma natureza básica (possui dois resíduos carregados positivamente (Arg + Lys) e seu ponto isoelétrico teórico foi de 10.35. O peptídeo híbrido não possui resíduos carregados negativamente (Asp + Glu) importantes nas interações com IgE e desencadeamento da resposta alérgica. De acordo com o índice de instabilidade, vimos na literatura que uma proteína é considerada estável quando seu índice de instabilidade é menor que 40 (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990). Nosso peptídeo híbrido de células T foi considerado instável, pois apresentou índice de instabilidade de 83.95. O peptídeo híbrido de células T apresentou de índice alifático 66.36, considerado uma razoável estabilidade térmica. Estes dados justificam a estabilidade e resistência a clivagens enzimáticas no trato digestivo das albuminas 2S.

A composição da estrutura secundária do peptídeo híbrido de células T foi aproximadamente de 56% de α -hélices e 39% de estrutura randômica. Rubinstein *et al.*, (2008) descreveu que os epítomos são compostos por estruturas irregulares, ou seja, estruturas secundárias não organizadas conhecidas como “*loops*”, e sabemos que os *loops* são considerados mais flexíveis quando comparados com os outros tipos de estruturas. Desta forma, podemos sugerir que, o nosso peptídeo híbrido de células T

por apresentar aproximadamente 39% de estrutura randômica com característica de estrutura irregular é relativamente flexível.

Sabemos que a imunoterapia com alérgenos inteiros, que é a forma mais praticada na área médica, apresenta riscos de desenvolver efeitos colaterais graves, já que apresentam epítomos de células B que induzem a reticulação da IgE encontradas na superfície das células efectoras da resposta alérgica. Desta forma, surge a estratégia de imunoterapia baseada em peptídeos, que visa identificar e reter os epítomos de células T, desviando assim da reticulação da IgE através da eliminação dos epítomos de células B (YANG; MINE, 2009).

Em contrapartida, os tratamentos com peptídeos sintéticos são considerados potenciais candidatos a vacinas por serem compostos por pequenos fragmentos presentes nos epítomos de proteínas antigênicas, característica esta que diverge das vacinas tradicionais. Além disso, as vacinas derivadas de peptídeos apresentam vantagens por serem seguras, induzem uma resposta imunológica bem definida, podem ser produzidas em alta escala e com ótimo grau de pureza (WANG *et al.*, 2003).

Mas para que um peptídeo seja considerado um possível candidato a uma vacina é necessário que ele possua um potencial imunogênico, ou seja, capacidade de induzir uma resposta imune protetora. É importante ressaltar também que o potencial alergênico deve ser reduzido, e assim, pode ser alcançado o sucesso do tratamento atingindo o estado de tolerância imunológica (SATITSUKSANOVA *et al.*, 2018).

Desta forma, torna-se necessário avaliar a antigenicidade do peptídeo híbrido de células T, no qual avaliamos primeiramente pelo software *ANTIGENpro*, que apresenta valor limite de predição igual a 0,4. O software *ANTIGENpro* é um modelo de predição de antigenicidade que se baseia em sequência, apresenta precisão de 76% e é capaz de classificar assertivamente 82% dos antígenos protetores conhecidos. Através do *ANTIGENpro* é possível prever as chances de uma proteína atuar como antígeno protetor (MAGNAN *et al.*, 2010). Após enviar a sequência do peptídeo de células T ao *ANTIGENpro* observamos que ele apresentou como probabilidade de antigenicidade de 0.118593, que foi considerado baixo potencial. Após, resolvemos avaliar também pelo programa *Predicted Antigenic Peptides* qual segmento da sequência do peptídeo que estava mais relacionado com a capacidade de estimular a síntese de anticorpos. Observamos que o peptídeo híbrido possui um fragmento na posição 4-18 (AVRQQQMVQQISPSQ) que apresenta ação antigênica.

Através de estudos *in silico* mostramos a importância das ferramentas de bioinformática de predição de epítomos de células B e T para prospecção de novas vacinas, o que viabiliza os custos e tempos com experimentos laboratoriais. Demonstramos que o estudo *in silico* nos permitiu analisar e selecionar peptídeos para

a prospecção de uma imunoterapia híbrida baseada em peptídeos como uma nova abordagem terapêutica para a alergia alimentar.

A segunda etapa deste trabalho foi caracterizar os alérgenos para prosseguir com os ensaios *in vitro* e *in vivo*. Após a análise *in silico*, definimos então extrair, purificar e caracterizar as proteínas albuminas 2S de gergelim e amendoim, que são oleaginosas comumente consumida no mundo todo. Após a extração de proteínas das oleaginosas, foi possível extrair e purificar em matriz G-50 (figuras 28 e 29). As frações foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE (figura 30). De acordo com Subcomitê de Nomenclatura dos Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia, as proteínas albuminas 2S das oleaginosas apresentam massas moleculares que variam entre 7 a 17 kDa, e em nossos resultados vimos proteínas de gergelim e amendoim que apresentaram massas moleculares próximas de 12 kDa.

De posse das proteínas purificadas de albuminas 2S de gergelim e amendoim, investigamos a alergenicidade dessas proteínas no modelo animal de camundongos BALB/c, linhagem comumente utilizada em estudos de asma (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008). Avaliamos as respostas das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgE, com o protocolo de sensibilização com intervalo de 7 dias, sendo 3 administrações de 50 µg de proteínas albumina 2S de amendoim e gergelim (figuras 32 e 33). Observamos a produção das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgE nos soros dos animais imunizados com as duas proteínas. Níveis altos de IgG1 foram detectados, indicando assim, que houve a sensibilização alérgica, pois, já foi descrito que as imunoglobulinas IgG1 também estão associadas às células Th2 (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996). Níveis altos de IgE também são esperados para o padrão de resposta nas doenças alérgicas, porém, os resultados indicam que as proteínas albuminas 2S não induziram altas respostas de IgE nos camundongos. Estes achados podem ser explicados pelo tempo das imunizações dos animais, já que no estudo foi empregado uma imunização semanal durante 14 dias, como também a baixa quantidade das proteínas administradas (50 µg), o que torna difícil a detecção e quantificação dos níveis de anticorpos através do ELISA convencional.

Um trabalho com alérgenos de fontes distintas também demonstrou a indução de altos níveis de IgG1, porém, diferentemente do protocolo empregado neste estudo, a imunização foi contínua por um período de 27 semanas administrando 5 mg de alérgenos recombinantes. Também foi relatado que a potência alergênica da proteína em questão influencia na imunogenicidade (VRTALA *et al.*, 1998).

Estudos empregando peptídeos para o tratamento de doenças alérgicas vêm sendo realizado por diversos grupos de pesquisas. Nesse sentido, o nosso próximo passo foi investigar a ação do peptídeo sintético híbrido de células T através de estudos de proliferação de células do baço, pois, já foi descrito que elas podem ser utilizadas

como um bom modelo de imunogenicidade para avaliar a capacidade de proliferação das células (GLASPOLE *et al.*, 2005; MIZUMACHI; KURISAKI, 2003).

Em estudos de proliferação de células T do alérgeno do ovo, pesquisadores conseguiram identificar quatro sequências com potencial imunogênico, e esses dados contribuíram com o desenvolvimento de imunoterapias baseadas em peptídeos (YANG; MINE, 2009). Outro estudo com peptídeo derivado do alérgeno de cedro japonês, Cry j 2, demonstrou que o peptídeo administrado oralmente induziu a tolerância oral em respostas de células T contra o alérgeno, atuando na redução de citocinas do perfil Th1 e Th2 (HIRAHARA *et al.*, 1998).

Desta forma, a partir de animais previamente sensibilizados 5 vezes ao longo de 29 dias, sendo 1 vez na semana, com 40 µg de albumina 2S de amendoim e de gergelim na presença e ausência de adjuvante, avaliamos a capacidade proliferativa e as respostas de citocinas das células do baço, que foram submetidas a estimulação com as proteínas albuminas 2S de amendoim e gergelim (2 mg/mL), e ao peptídeo híbrido de células T (200 µg/mL). O resultado apresentado na figura 33 nos mostra a proliferação celular dos animais sensibilizados/ou não com as proteínas de gergelim, e após receberem o tratamento com peptídeo híbrido. No grupo dos animais não tratados (**A**) e no grupo dos animais tratados (**B**) com o peptídeo híbrido *in vivo* não foi possível observar uma proliferação celular estatisticamente significativa. Já a figura 34 nos mostra a proliferação celular dos animais sensibilizados/ou não com as proteínas de amendoim, e após receberem o tratamento com peptídeo híbrido. No grupo dos animais não tratados (**A**), observamos uma resposta proliferativa celular maior nos animais sensibilizados com a proteína de amendoim e estimulados com o peptídeo híbrido. No grupo dos animais tratados (**B**) foi observado uma discreta proliferação celular nos animais nos animais sensibilizados com PA e tratados com Pp após receberem os estímulos, porém, essa resposta não foi estatisticamente significativa. A partir destes dados, nos torna evidente que animais sensibilizados e não sensibilizados tiveram uma resposta proliferativa celular muito semelhante, exceto os animais sensibilizados com amendoim que apresentaram proliferação celular um pouco superior. E quanto a proliferação celular após o tratamento *in vivo* com o peptídeo híbrido, os animais sensibilizados com gergelim e estimulados com o peptídeo híbrido apresentaram maior proliferação celular.

De acordo com a sensibilização que o organismo é exposto são definidos os tipos de citocinas que irão desempenhar suas funções no sistema imune. No padrão de resposta Th2 são produzidas as citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, e o perfil Th1 são produzidas a IL-12 e IFN-γ, e quando um perfil de resposta está ativo, conseqüentemente ele suprime o perfil oposto (RAMALINGAM *et al.*, 2016). Sabe-se

também que o IFN- γ está relacionado com respostas inflamatórias (BAE *et al.*, 2016). Avaliamos os níveis de citocinas a partir do meio de cultura de células do baço após estimulação com as proteínas albuminas 2S de gergelim e amendoim e com peptídeo híbrido de células T. A figura 35 nos mostra a produção de TNF- α das células dos baços dos animais sensibilizados/ou não com as proteínas de gergelim, e após receberem o tratamento com peptídeo híbrido. Para as células dos baços dos animais sensibilizados com proteínas de gergelim *in vivo*, foi possível detectar níveis mais elevados da produção de TNF- α quando as células foram estimuladas *in vitro* com a proteína de gergelim, porém, essa resposta não foi estatisticamente significativa. Já para as células dos baços dos animais tratados com o peptídeo *híbrido in vivo* e estimuladas *in vitro* com a proteína de gergelim os níveis de TNF- α se aproximaram dos valores dos animais não sensibilizados e estimulados com PG. Não foi possível detectar níveis IL-2 e IL-4.

A baixa detecção da IL-5 e a não detecção de IL-4, citocinas do padrão de resposta Th2, pode estar relacionada à estabilidade dessas citocinas nas culturas de células. Apesar disso, verificamos na figura 37 a presença de um nível maior de IFN- γ tanto nas células dos animais sensibilizados *in vivo* ao serem estimuladas com a proteína de gergelim, quanto nos animais tratados com o peptídeo híbrido *in vivo* também estimulados com a proteína de gergelim. O IFN- γ é uma citocina do perfil Th1 indispensável para restaurar o equilíbrio das respostas Th1/Th2 após o tratamento com imunoterapias (CAMPBELL *et al.*, 2009; SUÁREZ-FUEYO *et al.*, 2014). Sabemos que o IFN- γ é capaz de suprimir a produção de IgE, e em contrapartida, atua na indução da produção de IgG, um anticorpo com ação protetora (SEHRA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Quando as células do baço dos animais sensibilizados/ou não com as proteínas de amendoim *in vivo* (figura 36), foi possível detectar níveis mais altos de TNF- α quando as células receberam estímulos *in vitro* com a proteína de amendoim. A maior produção de TNF- α também foi demonstrada nas células que receberam o tratamento *in vivo* com o peptídeo híbrido e estimulada com a proteína de amendoim *in vitro*. Em relação a citocina IFN- γ , a figura 38 nos mostra um nível elevado de IFN- γ nas células estimuladas com a proteína de amendoim, e nas células dos animais tratados com o peptídeo híbrido *in vivo* quando estimuladas com a proteína de amendoim. Não houve produção de IL-5, IL-4 e IL-2.

Ao realizarmos uma busca na literatura sobre protocolos de sensibilizações e de tratamentos com peptídeos, pudemos constatar que diversos autores sensibilizam os animais com uma quantidade de alérgenos alimentares superior ao que empregamos neste estudo, e no tratamento com peptídeos de células T são utilizadas doses mais

altas, e em alguns casos, administradas mais de uma vez por semana, o que pode influenciar nos resultados de proliferação de células e produção de citocinas.

Wai *et al.* (2016) induziram a alergia ao camarão em animais administrando 4 doses de 100 µg do alérgeno de camarão recombinante na presença do adjuvante de toxina de cólera, seguido do desafio de 500 µg. Os animais foram tratados 2 vezes por semana por 4 semanas com uma mistura de 200 µg de 6 peptídeos de células T, totalizando 1200 µg, e uma semana após o último dia do tratamento os animais foram desafiados com 500 µg do alérgeno recombinante. Os autores observaram que na cultura dos esplenócitos dos animais tratados apresentaram baixos níveis de citocinas IL-4 e IL-5, e altos níveis de IFN-γ, restaurando o equilíbrio da resposta Th1/Th2. Misra *et al.* (2010), sensibilizaram previamente os animais com 100 µg de proteínas, realizaram a cultura de células estimulada com 100 µg de proteínas, para posteriormente avaliarem no sobrenadante os níveis de IL-4 e IL-10. Os autores observaram uma regulação importante nos níveis de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) e uma regulação negativa de IFN-γ, citocina do padrão de resposta Th1. No nosso estudo, as células foram estimuladas com 200 µg de proteínas, porém, devido as sensibilizações dos animais terem sido realizadas com 40 µg e por um curto prazo, as células não responderam muito bem aos estímulos realizados. Shamji *et al.* (2017) também apontam que a baixa ocorrência de células T específicas para os alérgenos pode comprometer em diluição do sinal de citocinas presentes no pool de citocinas produzidas pelas células T.

Jutel *et al.* (2003) desenvolveram uma ASIT para o tratamento de alergias decorrentes de aeroalérgenos. Os pacientes do estudo receberam três doses crescentes da ASIT, com intervalo de 30 minutos e aplicados semanalmente. Doses de manutenção mensalmente foram administradas e analisado os soros dos pacientes antes e após o tratamento, e o desvio da resposta imune foi avaliado em testes de proliferação de células T e do perfil de citocinas. Observou-se que após o tratamento, a proliferação específica foi suprimida nos pacientes e a proliferação induzida pelo antígeno controle não alterou. Após 28 dias do tratamento houve um aumento de IL-10 e TGF-β, observando uma diminuição de IL-5, IL-13 e IFN-γ. Um ponto que nos chamou atenção e diverge do protocolo deste estudo de cultura de células foi que, os sobrenadantes foram coletados no 5º dia para avaliar os níveis de citocinas, e a proliferação de células T foi determinada através de estímulos com os alérgenos por 6 dias. Na cultura de células realizada neste trabalho, as células do baço foram estimuladas por 3 dias com as proteínas e o peptídeo híbrido de células T, para que assim o sobrenadante fosse coletado e avaliado a capacidade proliferativa e a produção de citocinas. Talvez o tempo do estímulo das células possa também estar relacionado

com a baixa resposta de proliferação das células, além da baixa quantidade de proteínas utilizadas nas sensibilizações dos animais e o curto prazo empregado nas sensibilizações.

Existem pesquisas que investigaram qual mecanismo envolvido na diminuição da proliferação de células T, e foi demonstrado através de ensaio de bloqueio dos efeitos da IL-10 e de TGF- β que essas duas citocinas que atuam como supressoras. Pesquisadores mostraram que com a indução da tolerância nas células T e a neutralização da IL-10 e TGF- β pode haver um aumento das respostas da proliferação de células T aos alérgenos Der p 1 e Bet v 1 (JUTEL *et al.*, 2003). A IL-10 é uma citocina com ação regulatória imunomoduladora através da supressão da resposta inflamatória a fim de atingir a homeostasia. Ela age como uma citocina reguladora, capaz de suprimir a ação das citocinas do perfil Th1 e Th2, diminuir a produção de IgE e reduzir os sintomas das doenças alérgicas e inflamatórias (NEDELKOPOULOU *et al.*, 2020). Outros pesquisadores descreveram que a apresentação de antígenos às células APC's é suprimida pela ação da IL-10, o que conseqüentemente impacta no estímulo das células T (KABBUR *et al.*, 2006).

Há outras pesquisas que relatam que a indução local das células T reguladoras através da entrega de terapia baseada em peptídeos de células T é fundamental para atingir o estado de tolerância às células T e assim melhorar os aspectos da alergia (WAI *et al.*, 2016).

Não podemos deixar de levar em conta o processamento do peptídeo híbrido pelas células APC's, pois, durante o processamento do peptídeo, a apresentação dos fragmentos pelas APC's via MHCII pode não ter sido tão eficaz, impactando assim na atividade estimuladora das células T. Pesquisadores também apontaram que os resíduos de cisteínas podem influenciar sobre as respostas de proliferação de células T, visto que, eles participam da formação de pontes dissulfeto nos alérgenos. Quando os resíduos de cisteínas de um peptídeo foram substituídos pela serina foi confirmada a atividade estimuladora sobre a proliferação das células T (MIZUMACHI; KURISAKI, 2003). Vale a pena lembrar que o nosso peptídeo híbrido (IRQAVRQQMVQQISPSQGCQF) contém um resíduo de cisteína, e mais análises seriam necessárias para avaliar o efeito da substituição deste resíduo no peptídeo e a sua influência na estimulação da proliferação de células.

Por fim, após investigar a ação do peptídeo híbrido de células T através de estudos de proliferação em células e da produção de citocinas, avaliamos o tratamento *in vivo* com o peptídeo híbrido nos camundongos previamente sensibilizados (figura 11). Os animais receberam 4 doses de 200 μ g do tratamento via intraperitoneal, e após uma semana receberam uma dose de desafio com 100 μ g de proteínas de gergelim e

amendoim. Nos animais previamente sensibilizados com gergelim, foi possível observar no tratamento com o peptídeo híbrido uma redução nos níveis das imunoglobulinas IgG1 e IgE, quando comparado as dosagens das imunizações, com os tratamentos e os desafios com as proteínas.

Diante disso, observamos que, para atingir a tolerância imunológica com o tratamento da imunoterapia é esperado a alteração da resposta do perfil Th2 para Th1. Assim, é previsto uma regulação negativa das citocinas produzidas na resposta Th2 (IL-4, IL-13 e IL-9) e de citocinas inflamatórias (IL-17 ou TNF- α), e a regulação positiva das citocinas Th1 (IL-12 e IFN- γ) e das citocinas reguladoras (IL-10 e TGF- β) (SHAMJI *et al.*, 2017).

Pudemos relatar neste estudo a importância de identificar regiões de epítopos de células T imunodominantes para a prospecção de uma possível imunoterapia baseada em peptídeos de células T. Acreditamos que o peptídeo híbrido de células T derivado das oleaginosas identificados neste estudo é de interesse e que após mais estudos possa a ser no futuro traduzido para uso clínico. Estudos avaliando qual a melhor dosagem do peptídeo híbrido a ser empregada, o tempo de tratamento, examinando o perfil das imunoglobulinas e a expressão de citocinas em culturas estimuladas pelo peptídeo híbrido serão necessários para a sua validação.

Por fim, com base nas características do peptídeo sintético híbrido de células T e do seu efeito sobre a produção de citocinas, torna-se necessário mais estudos *in vitro* e *in vivo* a fim de comprovar o seu potencial efeito imunomodulador e assim, poder ser utilizada na alergia alimentar.

7. Conclusão

- Os estudos *in silico* forneceram suporte para a prospecção do peptídeo híbrido de células T (**IRQAVRQQQMVQQISPSQGCQF**).
- Na predição de epítomos, vários métodos devem ser combinados para obter resultados com maior fidelidade.
- O peptídeo híbrido IRQAVRQQQMVQQISPSQGCQF que contém epítomos de células T dos alérgenos de gergelim (Ses i 1), amendoim (Ara h 6), pistache (Pis v 1) e castanha de caju (Ana o 3), empregado no tratamento de animais sensibilizados com alérgenos de amendoim e de gergelim reduziu os níveis séricos de IgE e de IgG1, demonstrando a sua potencial ação imunomoduladora, sendo um possível candidato para vacinas baseadas em peptídeos.
- O peptídeo híbrido possui o fragmento AVRQQQMVQQISPSQ que apresenta ação antigênica, que é uma característica importante para que ela seja considerado um possível candidato a uma vacina.
- Mais estudos *in vivo*, complementares são necessários para ajustes da quantidade do alérgeno e do tempo de sensibilização, bem como as doses e o tempo de tratamento com o peptídeo híbrido.

8. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, Ed. Elsevier, 11ª. Edição, 2011.

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. **Functional diversity of helper T - lymphocytes**. , 1996.

AGACHE, I.; AKDIS, C. A. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. **Allergology International**, v. 65, n. 3, p. 243–252, 2016.

AHN, K. et al. Identification of two pistachio allergens, Pis v 1 and Pis v 2, belonging to the 2S albumin and 11S globulin family. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 926–934, 2009.

AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 738–744, 2006.

ARMENTEROS, J. J. A. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019.

BAE, H. R. et al. Gamma Leads to Murine Autoimmune Cholangitis With a Female Predominance. **Hepatology**, v. 64, n. 4, p. 1189–1201, 2016.

BARRE, A. et al. IgE-Binding Epitopes of Pis v 1, Pis v 2 and Pis v 3, the Pistachio (*Pistacia vera*) Seed Allergens. **Allergies**, v. 1, n. 1, p. 63–91, 2021.

BEYER, K. et al. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut- induced systemic reactions. **J Allergy Clin Immunol**, v. 110, n. 3, p. 517–523, 2002.

BLANKESTIJN, M. A. et al. Specific IgE to peanut 2S albumin Ara h 7 has a discriminative ability comparable to Ara h 2 and 6. **Clin Exp Allergy**, v. 48, p. 60–65, 2018.

BLECHA, I. M. Z. et al. Analysis of Bm86 conserved epitopes: Is a global vaccine against cattle tick *rhhipicephalus microplus* possible? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 3, p. 267–279, 2018.

BONKU, R.; YU, J. Food Science and Human Wellness Health aspects of peanuts as an outcome of its chemical composition. **Food Science and Human Wellness**, v. 9, n. 1, p. 21–30, 2020.

BREITENEDER, H. et al. Future research trends in understanding the mechanisms underlying allergic diseases for improved patient care. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 74, n. 12, p. 2293–2311, 2019.

BREITENEDER, H.; MILLS, E. N. C. Plant food allergens — structural and functional aspects of allergenicity. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 395–399, 2005.

BRITO, R. C. F. Identificação de novos antígenos candidatos vacinais contra Leishmaniose Visceral Canina no genoma de *L. infantum* utilizando a Bioinformática como ferramenta. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** -

Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, p. 96. 2014.

CAMPBELL, J. D. et al. Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10 – dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 7, p. 1535–1547, 2009.

CASALE, T. B.; STOKES, J. R. Future forms of immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 1, p. 8–15, 2011.

COLLINS, F.; VARMUS, H. New engla nd journal. **The New England Journal of Medicine**, n. 1, p. 1–3, 2015.

COMMINS, S. P. et al. Peanut Allergy: New Developments and Clinical Implications. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 16, p. 1–6, 2016.

COSTA, M. M. et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 5, p. 2172–2184, 2011.

DALL, F. et al. Structure of allergens and structure based epitope predictions. **Methods**, v. 66, p. 3–21, 2014.

DANIELL, H.; KULIS, M.; HERZOG, R. W. Plant cell-made protein antigens for induction of Oral tolerance. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 107413, 2019.

DE CAMPOS MESQUITA, D. M. et al. Blocking IgE with L-glutamic acid analogs as an alternative approach to allergy treatment. **European Journal of Biological Research**, v. 13, n. 1, p. 31–40, 2023.

DE OLIVEIRA LOPES, D. et al. Identification of a vaccine against schistosomiasis using bioinformatics and molecular modeling tools. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 83–95, 2013.

DE SOUZA, C. et al. Rational selection of immunodominant and preserved epitope Sm043300e from *Schistosoma mansoni* and design of a chimeric molecule for biotechnological purposes. **Molecular Immunology**, v. 93, n. August 2017, p. 133–143, 2018.

DESAI, D. V.; KULKARNI-KALE, U. T-Cell Epitope Prediction Methods: An Overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 1184, p. 333–364, 2014.

DEUS-DE-OLIVEIRA, N., FELIX, S. P., CARRIELO-GAMA, C., FERNANDES, K. V., DAMATTA, R. A., & MACHADO, O. L. (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. **PloSOne**, 6(6), e21455.

DEVONSHIRE, A. L.; LIN, A. A. Tac k l i n g F o o d A l l e r g y i n I n f a n c y. **Immunol Allergy Clin**, v. 41, p. 205–219, 2021.

DIPTI, C. A.; JAIN, S. K.; NAVIN, K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein Expression and Purification**, v. 47, n. 1, p. 319–328, 2006.

DRESKIN, S. C. et al. The importance of the 2S albumins for allergenicity and cross-

reactivity of peanuts, tree nuts, and sesame seeds. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 4, p. 1154–1163, 2021.

EGUILUZ-GRACIA, I. et al. **Recent developments and highlights in biomarkers in allergic diseases and asthma**. [s.l.: s.n.]. v. 73

EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. **Journal of Molecular Recognition**, v. 21, n. 4, p. 243–255, 2008.

EL-QUTOB, D. et al. Peptide-Based Allergen Specific Immunotherapy for the Treatment of Allergic Disorders. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 9, n. 1, p. 16–22, 2015.

ELIZUR, A. et al. Clinical and Molecular Characterization of Walnut and Pecan Allergy (NUT CRACKER Study). **The Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice**, v. 8, n. 1, p. 157- 165.e2, 2020.

FABER, M. A. et al. Sensitization profiles to peanut allergens in Belgium; cracking the code in infants, children and adults. **Acta Clinica Belgica: International Journal of Clinical and Laboratory Medicine**, v. 71, n. 1, p. 32–37, 2016.

FARIA, A. R. et al. High-throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, p. e1310, 2011.

FDA.gov. (2023). Food Allergies: What You Need to Know about. <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/food-allergies-what-you-need-know>.

FOOD ALLERGEN LABELING AND CONSUMER PROTECTION Act of 2004. Public Law 108-282, Title II. <https://www.fda.gov/food/food-allergensgluten-free-guidance-documents-regulatory-information/food-allergen-labeling-and-consumer-protection-act-2004-falcpa>.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 04, p. 335–339, 1997.

GAO, Q. et al. T cell epitope of arginine kinase with CpG co-encapsulated nanoparticles attenuates a shrimp allergen-induced Th2-bias food allergy. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 84, n. 4, p. 804–814, 2020.

GEHLHAR, K. et al. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, p. 497–506, 1999.

GLASPOLE, I. N. et al. Characterization of the T-cell epitopes of a major peanut allergen, Ara h 2. **Allergy**, v. 60, n. 1, p. 35–40, 2005.

GŁOBIŃSKA, A. et al. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Diverse mechanisms of immune tolerance to allergens. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 121, n. 3, p. 306–312, 2018.

GOLDBERG, A. C.; RIZZO, L. V. Estrutura do MHC e função – apresentação de antígenos . Parte 1 MHC structure and function – antigen presentation . Part 1. **Einstein**, v. 13, n. 11, p. 153–156, 2015.

- GONÇALVES, L. C. P. et al. Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil. **Allergologia et immunopathologia**, 2016.
- GROOT, A. S. DE et al. Better Epitope Discovery , Precision Immune Engineering , and Accelerated Vaccine Design Using Immunoinformatics Tools. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. April, p. 1–13, 2020.
- GUPTA, R. K. et al. Maillard reaction in food allergy : Pros and Cons. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 208–226, 2016.
- GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155–161, 1990.
- HIRAHARA, K. et al. Oral administration of a dominant T-cell determinant peptide inhibits allergen- specific TH1 and TH2 cell responses in Cry j 2 – primed mice. **J Allergy Clin Immunol**, v. 102, n. 6, p. 961–967, 1998.
- HOPP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 6, p. 3824–3828, 1981.
- HOYNE, G. F. et al. Inhibition of T-cell responses by feeding peptides containing major and cryptic epitopes : studies with the Der p I allergen. **Immunology**, v. 83, n. 2, p. 190–195, 1994.
- IKAI, A. Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. **J. Biochem.**, v. 88, n. 6, p. 1895–1898, 1980.
- JENSEN-JAROLIM, E.; JENSEN, A. N.; CANONICA, G. W. Debates in allergy medicine: Molecular allergy diagnosis with ISAC will replace screenings by skin prick test in the future. **World Allergy Organization Journal**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2017.
- JENSEN, K. K. et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. **Immunology**, v. 154, p. 394–406, 2018.
- JESPERSEN, M. C. et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. May, p. 24–29, 2017.
- JOO CHAN, C.; RICHARDO, T.; LIM, R. L. H. Current Trend in Immunotherapy for Peanut Allergy. **International Reviews of Immunology**, v. 37, n. 6, p. 279–290, 2019.
- JUTEL, M. et al. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. **European journal of immunology**, v. 33, n. 5, p. 1205–1214, 2003.
- KABBUR, P. M. et al. Interleukin-10 does not mediate inhalational tolerance in a chronic model of ovalbumin-induced allergic airway disease &. **Cellular Immunology**, v. 239, p. 67–74, 2006.
- KAPLI, P.; YANG, Z.; TELFORD, M. J. Phylogenetic tree building in the genomic age. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 7, p. 428–444, 2020.

KIM, E. H.; PATEL, C.; BURKS, A. W. Immunotherapy approaches for peanut allergy. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2020.

KRINGELUM, J. V. et al. Structural analysis of B-cell epitopes in antibody : protein complexes. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 1–2, p. 24–34, 2013.

KULIS, M. D. et al. Immune mechanisms of oral immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 491–498, 2018.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The " Classical " Ovalbumin Challenge Model of Asthma in Mice. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 6, p. 485–494, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LARCHE, M. Immunotherapy with Allergen Peptides. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology**, v. 3, n. 2, p. 53–59, 2007.

LARSEN, E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2006.

LARSEN, J. N.; BROGE, L.; JACOBI, H. Allergy immunotherapy: The future of allergy treatment. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 1, p. 26–37, 2016.

LINACERO, R. et al. Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods. **FOOD CHEMISTRY**, v. 202, p. 334–340, 2016.

LOZANO-OJALVO, D.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Immunomodulating peptides for food allergy prevention and treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–103, 2017.

MACDOUGALL, J. D.; BURKS, A. W.; KIM, E. H. Current insights into immunotherapy approaches for food allergy. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 1–8, 2021.

MACIEL, F. M. et al. A new 2S albumin from *Jatropha curcas L.* seeds and assessment of its allergenic properties. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2103–2107, 2009.

MAGNAN, C. N. et al. High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 23, p. 2936–2943, 2010.

MATRICARDI, P. M. et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 27, p. 1–250, 2016.

MCWILLIAM, V. L. et al. Prevalence and natural history of tree nut allergy. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, 2020.

MEILER, F. et al. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 63, n. 11, p. 1455–1463, 2008.

MENDES, C. et al. Cashew Nut Allergy: Clinical Relevance and Allergen Characterisation. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 57, p. 1–22, 2019.

MIZUMACHI, K.; KURISAKI, J. Localization of T Cell Epitope Regions of Chicken Ovomucoid Recognized by Mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 712–719, 2003.

MORENO, F. J.; CLEMENTE, A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? **The Open Biochemistry Journal**, v. 2, p. 16–28, 2008.

MUKHERJEE, M.; SEHMI, R.; NAIR, P. Anti-IL5 therapy for asthma and beyond. **World Allergy Organization Journal**, v. 7, p. 32, 2014.

MURPHY, K. et al. **Imunobiologia de Janeway**. 7^a ed. Porto Alegre: [s.n.].

NEDELKOPOULOU, N. et al. Interleukin 10: the critical role of a pleiotropic cytokine in food allergy. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 48, n. 4, p. 401–408, 2020.

NIELSEN, M.; LUND OLE. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. **BMC Bioinformática**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2009.

NILSSON, C. et al. Allergen components in diagnosing childhood hazelnut allergy: Systematic literature review and meta-analysis. **Pediatr Allergy Immunology**, v. 31, p. 186–196, 2020.

NUGRAHA, R.; KAMATH, S. D.; JOHNSTON, E. Conservation Analysis of B-Cell Allergen Epitopes to Predict Clinical Cross-Reactivity Between Shellfish and Inhalant Invertebrate Allergens. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2676, p. 1–13, 2019.

OCHFELD, E. N.; PONGRACIC, J. A. Food allergy: Diagnosis and treatment. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 40, n. 6, p. 446–449, 2019.

PASTORELLO, E. A. et al. Sensitization to the major allergen of Brazil nut is correlated with the clinical expression of allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, n. 6 I, p. 1021–1027, 1998.

PASTORELLO, E. A. et al. The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 756, n. 1–2, p. 85–93, 2001a.

PASTORELLO, E. A. et al. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. **J Allergy Clin Immunol**, v. 109, n. 3, p. 563–570, 2002.

PASTORELLO, E. A. et al. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. **Allergy**, v. 56 Suppl 6, n. 6, p. 45–47, 2001b.

PEKAR, J.; RET, D.; UNTERSMAJR, E. Stability of allergens. **Molecular Immunology**, v. 100, p. 14–20, 2018.

PEREIRA, V. A. R.; AUN, W. C. T.; MELLO, J. F. Mecanismos da imunoterapia alérgeno-específica. **Revista Oficial da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 3, p. 257–262, 2017.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

- PIHLASALO, S. et al. Method for estimation of protein isoelectric point. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 19, p. 8253–8258, 2012.
- POMÉS, A.; MUELLER, G. A.; CHRUSZCZ, M. Structural Aspects of the Allergen-Antibody Interaction. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 2067, p. 1–19, 2020.
- PRICKETT, S. R. et al. Safety and Tolerability of a Novel Peptide-Based Immunotherapy for Peanut Allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. AB431, 2019.
- QAMAR, S. et al. Nuts , cereals , seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages : A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–21, 2019.
- QUIJADA, L. et al. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* Hsp70 recognized by leishmaniasis sera. **Immunology Letters**, v. 52, n. 2–3, p. 73–79, 1996.
- RAMALINGAM, T. R. et al. Enhanced protection from fibrosis and inflammation in the combined absence of IL-13 and IFN- γ . **Journal of Pathology**, v. 239, p. 344–354, 2016.
- RAVETCHE, J. V.; KINET, J.-P. Fc Receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 9, n. 1, p. 457–492, 1991.
- ROBOTHAM, J. M. et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 6, p. 1284–1290, 2005.
- RUBINSTEIN, N. D. et al. Computational characterization of B-cell epitopes. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3477–3489, 2008.
- RUPA, P.; MINE, Y. Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy. **Allergy**, v. 67, n. 5, p. 74–82, 2012.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. BcePred : Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. **Springer**, p. 197–204, 2004.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction Methods for B-cell Epitopes. **Methods in Molecular Biology**, v. 409, n. 2, p. 387–394, 2007.
- SANCHEZ-TRINCADO, J. L.; GOMEZ-PEROSANZ, M.; RECHE, P. A. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–14, 2017.
- SATITSUKSANOVA, P. et al. Modified Allergens for Immunotherapy. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 18, n. 9, p. 1–13, 2018.
- SCADDING, G. W. et al. Effect of 2 Years of Treatment With Sublingual Grass Pollen Immunotherapy on Nasal Response to Allergen Challenge at 3 Years Among Patients With Moderate to Severe Seasonal Allergic Rhinitis. **Jama**, v. 317, n. 6, p. 615–625, 2017.
- SEHRA, S. et al. Airway IgG Counteracts Specific and Bystander Allergen-Triggered Pulmonary Inflammation by a Mechanism Dependent on Fc γ R and IFN- γ . **The Journal**

of **Immunology**, v. 171, n. 4, p. 2080–2089, 2003.

SHAMJI, M. H. et al. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. **Allergy**, v. 72, p. 1156–1173, 2017.

SHARMA, P.; GAUR, S. N.; ARORA, N. In silico Identification of IgE-Binding Epitopes of Osmotin Protein. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2013.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. **Methods in Molecular Biology**, v. 1079, p. 105–116, 2014.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 135–145, 2018.

SILVA, L. A. et al. Adult Food Allergy Prevalence: Reducing Questionnaire Bias. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 171, p. 261–264, 2016.

SOLÉ, D. et al. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2018 -Parte 2 - Diagnóstico, tratamento e prevenção. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. **Arq Asma Alerg Immunol**, v. 2, n. 1, p. 39–82, 2018.

SOUZA, A. et al. Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 55, n. 11, p. 665–694, 2010.

SUÁREZ-FUEYO, A. et al. Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the T H 2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 1, p. 130–138, 2014.

SUN, P. et al. Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

TABESH, S. et al. Design and evaluation of a hypoallergenic peptide-based vaccine for *Salsola kali* allergy. **International Immunopharmacology**, v. 66, n. August 2018, p. 62–68, 2019.

TEIXEIRA, L. K. et al. The role of interferon- γ on immune and allergic responses. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 137–144, 2005.

TEUBER, S. S. et al. Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from english walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, n. 6 I, p. 807–814, 1998.

ÜZÜLMEZ, Ö.; KALIC, T.; BREITENEDER, H. Advances and novel developments in molecular allergology. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 12, p. 3027–3038, 2020.

VALENTA, R.; CAMPANA, R.; NIEDERBERGER, V. Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes. [s.l.] **European Federation of Immunological Societies**, 2017.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Immunoinformatics may lead to a reappraisal of the

nature of B cell epitopes and of the feasibility of synthetic peptide vaccines. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 3, p. 183–187, 2006.

VIEIRA, S. C. F. et al. Brazilian pediatricians' adherence to food allergy guidelines — A cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 15, p. 1–13, 2020.

VRTALA, S. et al. Immunization with Purified Natural and Recombinant Allergens Induces Mouse IgG1 Antibodies That Recognize Similar Epitopes as Human IgE and Inhibit the Human IgE-Allergen Interaction and Allergen-Induced Basophil Degranulation. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 12, p. 6137–6144, 1998.

WAI, C. Y. Y. et al. T cell epitope immunotherapy ameliorates allergic responses in a murine model of shrimp allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 46, n. 3, p. 491–503, 2016.

WANG, S. BIN et al. Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model. **BMC Immunology**, v. 15, n. 1, 2014.

WANG, C. Y. et al. Synthetic IgE peptide vaccine for immunotherapy of allergy. **Vaccine**, v. 21, n. 15, p. 1580–1590, 2003.

WARREN, C. M.; JIANG, J.; GUPTA, R. S. Epidemiology and burden of food allergy. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 20, n. 2, p. 1–9, 2020.

WIENS, K. E. et al. Equivalent T Cell Epitope Promiscuity in Ecologically Diverse Human Pathogens. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–11, 2013.

WOLFF, N. et al. Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 8, p. 1165–1174, 2003.

WOLFF, N. et al. Identification and characterization of linear B-cell epitopes of β -globulin, a major allergen of sesame seeds. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 5, p. 1151–1158, 2004.

XU, L. L. et al. Identification of the Dominant T - Cell Epitopes of Lit v 1 Shrimp Major Allergen and Their Functional Overlap with Known B - Cell Epitopes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, p. 7420–7428, 2021.

YANG, M.; MINE, Y. Novel T-cell epitopes of ovalbumin in BALB/c mouse: Potential for peptide-immunotherapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 378, n. 2, p. 203–208, 2009.

YOULE, R. J.; HUANG, ANTHONY, H. C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. **Amer. J. Bot.**, v. 68, p. 44–48, 1981.

YU, W.; FREELAND, D. M. H.; NADEAU, K. C. Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 12, p. 751–765, 2016.

ZHAN, X. et al. Epitope-based vaccine for the treatment of Der f 3 allergy. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. 6, p. 2763–2770, 2015.

ZHANG, Y. L. et al. Molecular characterization and identification of Th1 epitopes of a *Schistosoma japonicum* protein similar to prosaposin. **Parasitology Research**, v. 113, n. 3, p. 983–992, 2014.

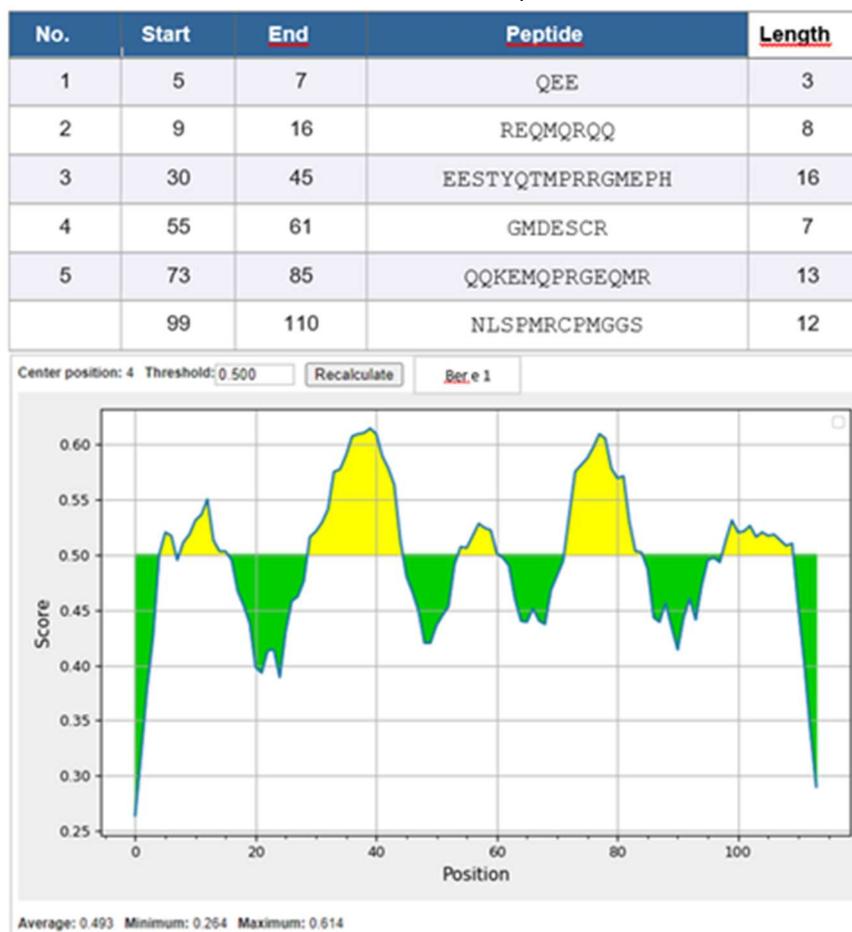
ZHOU, F. et al. Advances in epitope mapping technologies for food protein allergens: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 107, n. October 2020, p. 226–239, 2021.

APÊNDICE B - Epítomos de células B de **Ara h 2** preditos pelo método Bepipred e gráfico da escala de propensão. O eixo horizontal (score 0.50) indica o número de aminoácidos da sequência completa do alérgeno. O eixo vertical indica as regiões preditas para os epítomos, destacando as regiões em amarelo os aminoácidos que formam os epítomos lineares e na cor verde os aminoácidos que não formam epítomos. Considerando os valores: (Mínimo - 0,294; Máximo 0,699; Limiar 0,544).



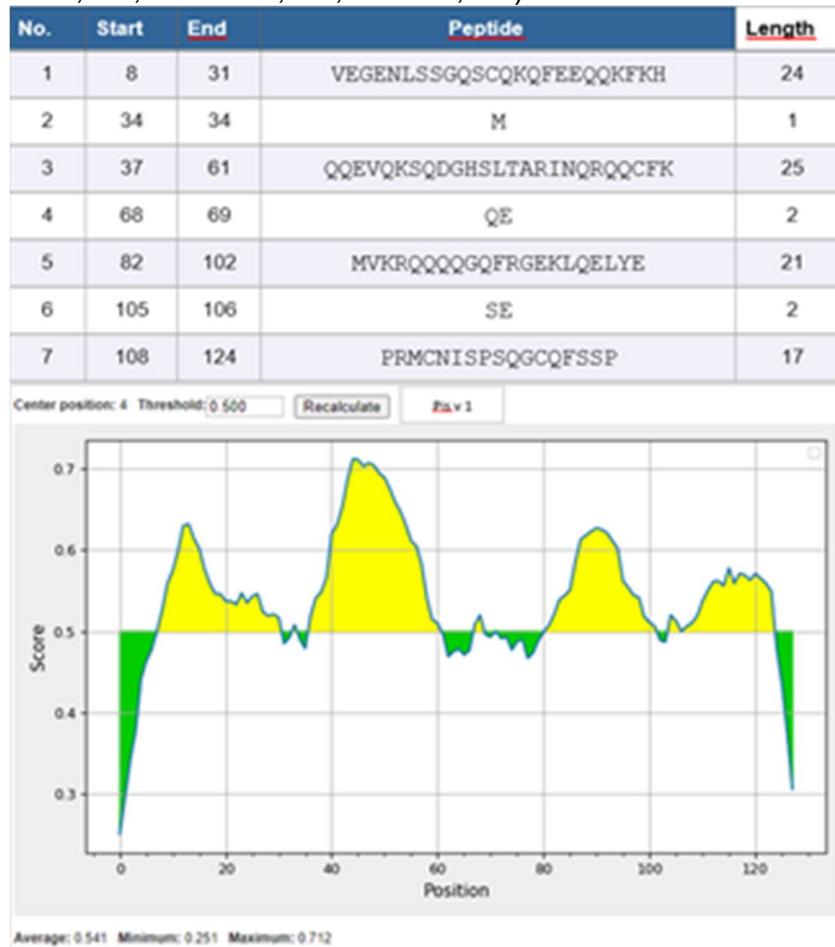
Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.

APÊNDICE C - Epítomos de células B de **Ber e 1** preditos pelo método Bepipred e gráfico da escala de propensão. O eixo horizontal (score 0.50) indica o número de aminoácidos da sequência completa do alérgeno. O eixo vertical indica as regiões preditas para os epítomos, destacando as regiões em amarelo os aminoácidos que formam os epítomos lineares e na cor verde os aminoácidos que não formam epítomos. Considerando os valores: (Mínimo - 0,264; Máximo 0,614; Limiar 0,493).



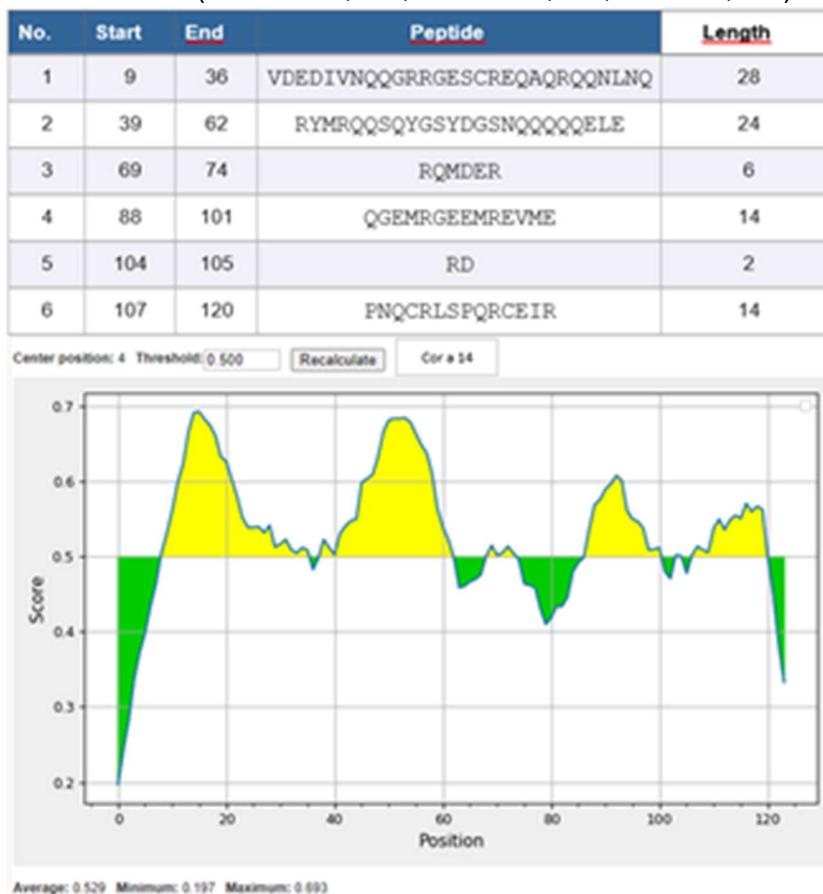
Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.

APÊNDICE D - Epítomos de células B de **Pis v 1** preditos pelo método Bepipred e gráfico da escala de propensão. O eixo horizontal (score 0.50) indica o número de aminoácidos da sequência completa do alérgeno. O eixo vertical indica as regiões preditas para os epítomos, destacando as regiões em amarelo os aminoácidos que formam os epítomos lineares e na cor verde os aminoácidos que não formam epítomos. Considerando os valores: (Mínimo - 0,251; Máximo 0,712; Limiar 0,541).



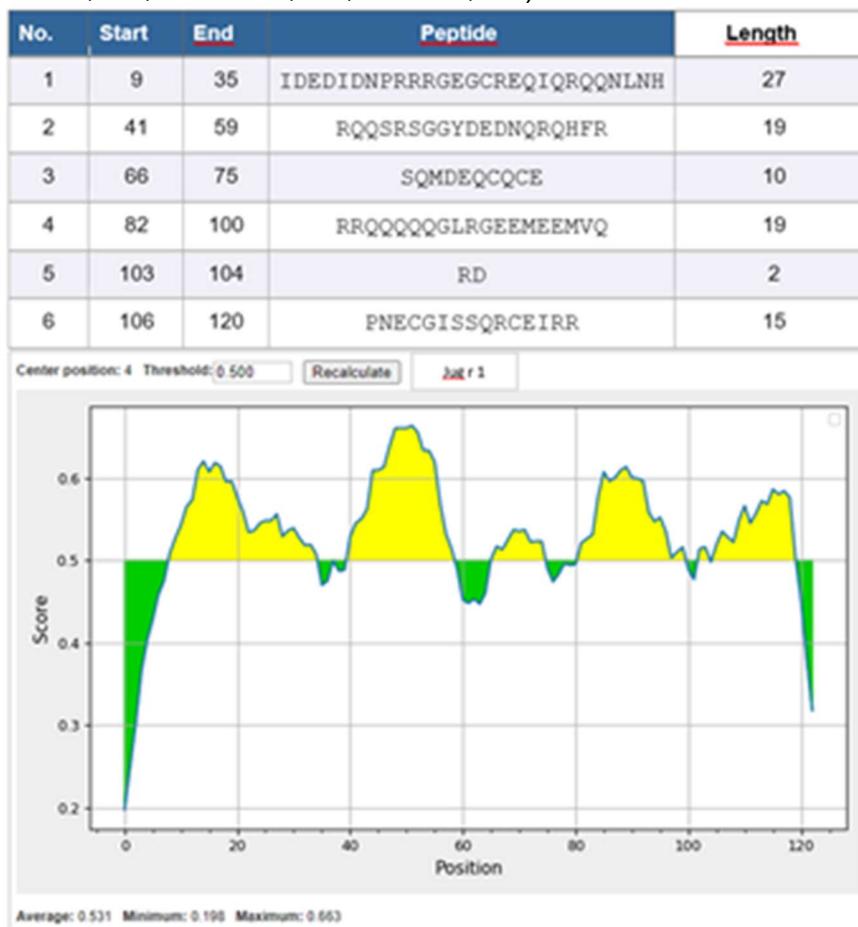
Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.

APÊNDICE E - Epítomos de células B de **Cor a 14** preditos pelo método Bepipred e gráfico da escala de propensão. O eixo horizontal (score 0.50) indica o número de aminoácidos da sequência completa do alérgeno. O eixo vertical indica as regiões preditas para os epítomos, destacando as regiões em amarelo os aminoácidos que formam os epítomos lineares e na cor verde os aminoácidos que não formam epítomos. Considerando os valores: (Mínimo - 0,197; Máximo 0,693; Limiar 0,529).



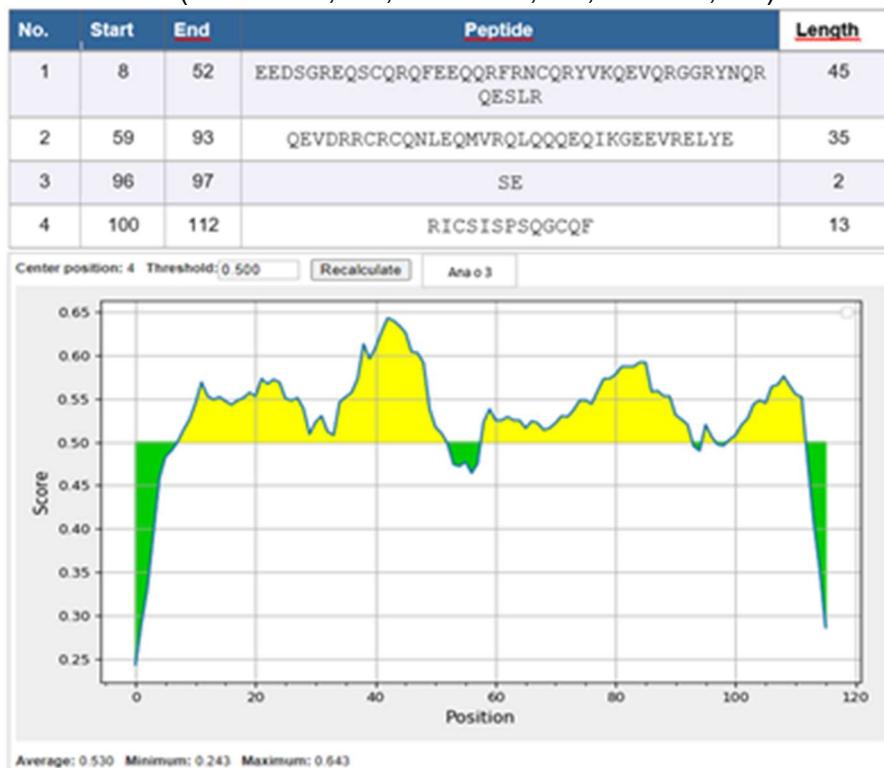
Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.

APÊNDICE F - Epítomos de células B de **Jug r 1** preditos pelo método Bepipred e gráfico da escala de propensão. O eixo horizontal (score 0.50) indica o número de aminoácidos da sequência completa do alérgeno. O eixo vertical indica as regiões preditas para os epítomos, destacando as regiões em amarelo os aminoácidos que formam os epítomos lineares e na cor verde os aminoácidos que não formam epítomos. Considerando os valores: (Mínimo - 0,197; Máximo 0,693; Limiar 0,529).



Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.

APÊNDICE G - Epítomos de células B de **Ana o 3** preditos pelo método Bepipred e gráfico da escala de propensão. O eixo horizontal (score 0.50) indica o número de aminoácidos da sequência completa do alérgeno. O eixo vertical indica as regiões preditas para os epítomos, destacando as regiões em amarelo os aminoácidos que formam os epítomos lineares e na cor verde os aminoácidos que não formam epítomos. Considerando os valores: (Mínimo - 0,243; Máximo 0,643; Limiar 0,530).



Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.

APÊNDICE H - Epítomos de células B do alérgeno **Ara h 2** preditos pelo método BcePred. Em vermelho está descrito a sequência completa do alérgeno, e em azul destaca-se as predições realizadas de acordo com as características físico-químicas dos aminoácidos.

Sequence	¹QWELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYERDPYSPSQDPYSF SPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRCEALQQIMENQSDRLQGRQC EQQFKRELRNLPQQCGLRAPQRCDLDVESGGRDRY¹³⁷
Hydrophilicity	¹ QWEL QGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYERDPYSPSQDPYSF SPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQR CEALQQI MENQSDRLQGRQC EQQFKRELRNLPQQCGLRAPQRCDLDVESGGRDRY¹³⁷
Flexibility	¹ Q WELQGDRRCQ SQLERANLRPCEQHLM QKIQRDE DSYER DPYSPSQDPYSF SPYDRRGAGSSQHQR CCNELNEFENNQR CEALQQIMENQSDRLQGRQC EQQFKRELRNLPQQCGLRAPQRCDLDVESGGRDRY¹³⁷
Exposed Surface	¹ QWELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHL MQKIQRDEDSYERDPYSPSQDPYSF SPYDRR GAGSSQHQRCCNELN EFENNQR CEALQQIMENQSDRL QGRQC EQQFKRELRNL PQQCGLRAPQRCDLDVESGG RDRY¹³⁷
Polarity	¹ QW ELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYERDPYSPSQDPYSF SPYDRRGAG SSQHQRCCNELNEFENNQR CEALQQI MENQSDRLQGRQC EQQFKRELRNLPQQCGLRAPQRCDLDVESGGRDRY¹³⁷

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcePred.

APÊNDICE I - Epítomos de células B do alérgeno **Ber e 1** preditos pelo método BcePred. Em vermelho está descrito a sequência completa do alérgeno, e em azul destaca-se as predições realizadas de acordo com as características físico-químicas dos aminoácidos.

Sequence	¹ EAEAQEECREQMQRQQMLSHCRM ^Y MRQQMEESTYQTM ^P RRGM ^E PHMS ECCEQLEGMDESCRCEGLRMM ^M MMQQKEMQPRGEQMRR ^M RLAENIP SRCNLSPMRC ^P MGGS ^I AGF ¹¹⁴
Hydrophilicity	¹ EAEAQEECREQMQRQQMLSHCRM ^Y MRQQMEESTYQTM ^P RRGM ^E PHMS ECCEQLEGMDESCRCEGLRMM ^M MMQQKEMQPRGEQMRR ^M RLAENIP SRCNLSPMRC ^P MGGS ^I AGF ¹¹⁴
Flexibility	¹ EAEAQEECREQMQRQQMLSHCRM ^Y MRQQMEESTYQTM ^P RRGM ^E PHMS ECCEQLEGMDESCRCEGLRMM ^M MMQQKEMQPRGEQMRR ^M RLAENIP SRCNLSPMRC ^P MGGS ^I AGF ¹¹⁴
Exposed Surface	¹ EAEAQEECREQMQRQQMLSHCRM ^Y MRQQMEESTYQTM ^P RRGM ^E PHMS ECCEQLEGMDESCRCEGLRMM ^M MMQQKEMQPRGEQMRR ^M RLAENIP SRCNLSPMRC ^P MGGS ^I AGF ¹¹⁴
Polarity	¹ EAEAQEECREQMQRQQMLSHCRM ^Y MRQQMEESTYQTM ^P RRGM ^E PHMS ECCEQLEGMDESCRCEGLRMM ^M MMQQKEMQPRGEQMRR ^M RLAENIP SRCNLSPMRC ^P MGGS ^I AGF ¹¹⁴

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcePred.

APÊNDICE J - Epítomos de células B do alérgeno **Pis v 1** preditos pelo método BcePred. Em vermelho está descrito a sequência completa do alérgeno, e em azul destaca-se as predições realizadas de acordo com as características físico-químicas dos aminoácidos.

Sequence	1 YRATVEVEGENLSSGQSCQKQFEEQQKFKHCQMYVQQEVQKSQDGHSL TARINQRQQCFKQCCQELQEVDKKCRCQNLEQMVKRQQQQGQFRGEKLQ ELYETASELPRMCNISPQGCQFSSPYWSY ¹²⁸
Hydrophilicity	1YRATVEVEGENLSSGQSCQKQFEEQQKFKHCQMYVQQEVQKSQDGHSL TARINQRQQCFKQCCQELQEVDKKCRCQNLEQMVKRQQQQGQFRGEKLQ ELYETASELPRMCNISPQGCQFSSPYWSY ¹²⁸
Flexibility	1YRATVEVEGENLSSGQSCQKQFEEQQKFKHCQMYVQQEVQKSQDGHSL TARINQRQQCFKQCCQELQEVDKKCRCQNLEQMVKRQQQQGQFRGEKLQ ELYETASELPRMCNISPQGCQFSSPYWSY ¹²⁸
Exposed Surface	1YRATVEVEGENLSSGQSCQKQFEEQQKFKHCQMYVQQEVQKSQDGHSL TARINQRQQCFKQCCQELQEVDKKCRCQNLEQMVKRQQQQGQFRGEKLQ ELYETASELPRMCNISPQGCQFSSPYWSY ¹²⁸
Polarity	1YRATVEVEGENLSSGQSCQKQFEEQQKFKHCQMYVQQEVQKSQDGHSL TARINQRQQCFKQCCQELQEVDKKCRCQNLEQMVKRQQQQGQFRGEKLQ ELYETASELPRMCNISPQGCQFSSPYWSY ¹²⁸

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcePred.

APÊNDICE K - Epítomos de células B do alérgeno **Cor a 14** preditos pelo método BcePred. Em vermelho está descrito a sequência completa do alérgeno, e em azul destaca-se as predições realizadas de acordo com as características físico-químicas dos aminoácidos.

Sequence	¹RTTITTVDVDEDIVNQQGRRGESCREQAQRQQNLNQCQRYMRQQSQYGS YDGSNQQQQQEQCCQQLRQMDERCRCEGLRQAVMQQQGEMRGEEM REVMETARDLPNQCRSLSPQRCEIRSARF¹²⁴
Hydrophilicity	¹ RTTIT TVDVDE DI VNQQGRRGESCREQAQRQQNLNQCQRYMRQQSQYGS YDGSNQQQQQEQCCQQLRQMDERCRCEGLRQAVMQQQGEMRGEEM REVMETARDLPNQCRSLSPQRCEIRSARF¹²⁴
Flexibility	¹ RTTITTVDVDE DIVNQQGRRGESCREQAQRQQNLNQCQRYMRQQSQYGS YDGSNQQQQQEQCCQQLRQMDERCRCEGLRQAVMQQQGEMRGEEM REVMETARDLPNQCRSLSPQRCEIRSARF¹²⁴
Exposed Surface	¹ RTTITTVDVDEDIVNQQGRRGES CREQAQRQQNLNQCQRYMRQQSQYGS YDGSNQQQQQEQCCQQLRQMDERCRCEGLRQAVMQQQGEMRGEEM REVMETARDLPNQCRSLSPQRCEIRSARF¹²⁴
Polarity	¹ RTTIT TVDVDE DI VNQQGRRGESCREQAQRQQNLNQCQRYMRQQSQYGS YDGSNQQQQQEQCCQQLRQMDERCRCEGLRQAVMQQQGEMRGEEM REVMETARDLPNQCRSLSPQRCEIRSARF¹²⁴

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcePred.

APÊNDICE L - Epítomos de células B do alérgeno **Jug r 1** preditos pelo método BcePred. Em vermelho está descrito a sequência completa do alérgeno, e em azul destaca-se as predições realizadas de acordo com as características físico-químicas dos aminoácidos.

Sequence	¹RTTITTMEIDEDIDNPRRRGEGCREQIQRQQNLNHCQYYLRQQSRSGGYD EDNQRQHFRQCCQQLSQMDEQCQCEGLRQVRRQQQQQLRGEEMEE MVQSARDLPNECGISSQRCEIRRSWF¹²³
Hydrophilicity	¹ RTTITTMEI DEDIDNPRRRGEGCREQ IQRQQNLNHCQYYL RQQSRSGGYD EDNQRQHFRQCCQQLSQMDEQCQCEGLRQVRRQQQQQLRGEEMEE MVQSARDLPNECGISSQRCEIRRSWF¹²³
Flexibility	¹ RTTITTMEI EDIDNPRRRGEG CREQIQRQQNLNHCQ YYLRQQSRSGGYD EDNQRQHFRQCCQQLSQMDEQCQCEGLRQVRRQQQQQLRGEEMEE MVQSARDLPNECGISSQRCEIRRSWF¹²³
Exposed Surface	¹ RTTITTMEI DEDIDNPRRRGE G CREQIQRQQNLN HCQYYLRQQSRSGGYD EDNQRQHFRQCCQQLSQMDEQCQCEGLRQVRRQQQQQLRGEEMEE MVQSARDLPNECGISSQRCEIRRSWF¹²³
Polarity	¹ RTTIT TMEIDEDIDNPRRRGEGCREQIQRQ QNLNHCQYYLRQQSRSGGYD EDNQRQHFRQC CQQLSQMDEQCQCE GLRQVRRQQQQQLRGEEMEE MVQSARDLPNECGISQRCEIRRSWF¹²³

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcePred.

APÊNDICE M - Epítomos de células B do alérgeno **Ana o 3** preditos pelo método BcePred. Em vermelho está descrito a sequência completa do alérgeno, e em azul destaca-se as predições realizadas de acordo com as características físico-químicas dos aminoácidos.

Sequence	¹YRAIVEEEDSGREQSCQRQFEEQQRFRNCQRYVKQEVQRGGRYNQRO ESLRECCQELQEVDRRRCRCQNLEQMVRQLQQQEQIKGEEVRELYETASEL PRICISPSQGCQFQSSY¹¹⁶
Hydrophilicity	¹ YRAI VEEEDSGREQSCQRQ FEEQQRFRNCQRYV KQEVQRGGRYNQRO ESLRECCQELQEVDRRCRCQNLEQMVRQLQQQEQIKGEEVRELYETASEL PRICISPSQGCQFQSSY¹¹⁶
Flexibility	¹ YRAI VEEEDSGREQSCQRQFEEQQRFRNCQRYVKQEVQRGGRYNQRO ESLRECCQELQEVDRRRCRCQNLEQMVRQLQQQEQIKGEEVRELYETASEL PRICISPSQGCQFQSSY¹¹⁶
Exposed Surface	¹ YRAIVEEEDSG REQSCQRQFEEQQRFRNCQRYVKQEVQRGGRYNQRO ESLRECCQELQEVDRRRCRCQNLEQMVRQLQQQEQIKGEEVRELYETASEL PRICISPSQGCQFQSSY¹¹⁶
Polarity	¹ YRAI VEEEDSGREQSCQRQFEEQQRFRNCQRYVKQEVQRGGRYNQRO ESLRECCQELQEVDRRRCRCQNLEQMVRQLQQQEQIKGEEVRELYETASEL PRICISPSQGCQFQSSY¹¹⁶

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcePred.

APÊNDICE N - Previsões de epítomos de células B do alérgeno **Ara h 2** através do método BCPred. Destaca-se em “E” na cor vermelha os resíduos de aminoácidos correspondentes aos epítomos de células B preditos, visto que acima encontra-se a sequência completa do alérgeno.

Position	Epitope	Score
48	PYSPSPYDRRGAGSSQHQER	0.987
98	QGRQEQQFKRELRNLPQQC	0.971
27	MQKIQRDEDSYERDPYSPSQ	0.966

```

1          11          21          31          41          51          6
0
|          |          |          |          |          |
|          |          |          |          |          |
QWELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYERDPYSPSQDPYSPSPYDRRGAG
60
.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.EEEEEEEEEEEEE
SSQHQERCCNELNEFENNQRCMCEALQQIMENQSDRLQGRQEQQFKRELRNLPQQCGLR
120
EEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE...
APQRCDLDVESGGRDRY 137

```

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcPred.

APÊNDICE O - Previsões de epítomos de células B do alérgeno **Ber e 1** através do método BCPred. Destaca-se em “E” na cor vermelha os resíduos de aminoácidos correspondentes aos epítomos de células B preditos, visto que acima encontra-se a sequência completa do alérgeno.

Position	Epitope	Score
1	EAEAQEECREQMQRQQMLSH	0.999
72	MQQKEMQPRGEQMRMMRLA	0.99
35	QTMPRRGMEPHMSECCEQLE	0.899

```

1          11          21          31          41          51          6
0
|          |          |          |          |          |
EAEAQEECREQMQRQQMLSHCRMYMRQMEESTYQTMPRRGMEPHMSECCEQLEGMDESC
60
EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....
RCEGLRMMMRMMQQKEMQPRGEQMRMMRLAENIPSRCNLSPMRCPMGGSIAGF 114
.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....

```

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcPred.

APÊNDICE P - Previsões de epítomos de células B do alérgeno **Pis v 1** através do método BCPred. Destaca-se em “E” na cor vermelha os resíduos de aminoácidos correspondentes aos epítomos de células B preditos, visto que acima encontra-se a sequência completa do alérgeno.

Position	Epitope	Score
83	VKRQQQQGQFRGEKLQELYE	0.995
27	QKFKHCQMYVQQEVQKSQDG	0.984
6	VEVEGENLSSGQSCQKQFEE	0.91
109	RMCNISPQGCQFSSPYWSY	0.887
54	NQRQQCFKQCCQELQEVDDK	0.863

```

1          11          21          31          41          51          6
0
|          |          |          |          |          |
IYRATVEVEGENLSSGQSCQKQFEEQQKFKHCQMYVQQEVQKSQDGHSLTARINQRQQCF
60
.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEE
KQCCQELQEVDDKKRCQNLEQMVKRQQQQGQFRGEKLQELYETASELPRMCNISPQGCQ
120
EEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEE
FSSPYWSY 128
EEEEEEEE

```

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcPred.

APÊNDICE Q - Previsões de epítomos de células B do alérgeno **Cor a 14** através do método BCPred. Destaca-se em “E” na cor vermelha os resíduos de aminoácidos correspondentes aos epítomos de células B preditos, visto que acima encontra-se a sequência completa do alérgeno.

Position	Epitope	Score
48	GSYDGSNQQQQQELEQCCQQ	1
11	EDIVNQQGRRGESCREQAQR	0.996
82	QAVMQQQGEMRGEEMREVME	0.981

```

1          11          21          31          41          51          6
0
|          |          |          |          |          |
|          |          |          |          |          |
RTTITTVDVDEDIVNQQGRRGESCREQAQRQONLNQCQRYMRQOSQYGSYDGSNQQQQQE
60
.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEE
LEQCCQQLRQMDERCRCEGLRQAVMQQQGEMRGEEMREVME TARDLPNQCRLSPQRCEIR
120
EEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....
SARF 124
.....

```

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcPred.

APÊNDICE R - Previsões de epítomos de células B do alérgeno **Jug r 1** através do método BCPred. Destaca-se em “E” na cor vermelha os resíduos de aminoácidos correspondentes aos epítomos de células B preditos, visto que acima encontra-se a sequência completa do alérgeno.

Position	Epitope	Score
80	VVRRQQQQQGLRGEEMEEMV	0.993
13	IDNPRRRGEGCREQIQRQQN	0.987
41	RQQRSGGYDEDNQRQHFRQ	0.919
103	RDLPNCEGISSQRCEIRRSW	0.869

```

1           11           21           31           41           51           6
0
|           |           |           |           |           |
RTTITMEIDEDIDNPRRRGEGCREQIQRQQNLNHCQYYLRQQRSGGYDEDNQRQHFRQ
60
.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE
CCQQLSQMDEQCQCEGLRQVVRRQQQQQGLRGEEMEEMVQSARDLPNECGISSQRCEIRR
120
.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE
SWF 123
EE.

```

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcPred.

APÊNDICE S - Previsões de epítomos de células B do alérgeno **Ana o 3** através do método BCPred. Destaca-se em “E” na cor vermelha os resíduos de aminoácidos correspondentes aos epítomos de células B preditos, visto que acima encontra-se a sequência completa do alérgeno.

Position	Epitope	Score
74	VRQLQQEQIKGEEVRELYE	1
3	AIVEVEEDSGREQSCQRQFE	0.996
31	QRYVKQEVQRGGRYNQRQES	0.99

```

1          11          21          31          41          51          6
0
|          |          |          |          |          |
YRAIVEVEEDSGREQSCQRQFEEQQRFRNCQRYVKQEVQRGGRYNQRQESLRECCQELQE
60
..EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....
VDRRCRCQNLEQMVRQLQQEQIKGEEVRELYETASELPRICISISPSQGCQFQSSY 116
.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....

```

Fonte: Elaborado pela autora, dados obtidos pelo método BcPred.