AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MUTANTE DE Ricinus Communis: (mrRic c 1) PARA O DESENVOLVIMENTO DE IMUNOTERAPIA ALÉRGENO-ESPECÍFICA

THAÍS PACHECO SOARES

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MUTANTE DE Ricinus Communis: (mrRic c 1) PARA O DESENVOLVIMENTO DE IMUNOTERAPIA ALÉRGENO-ESPECÍFICA

THAÍS PACHECO SOARES

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

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MUTANTE DE Ricinus Communis: (mrRic c 1) PARA O DESENVOLVIMENTO DE IMUNOTERAPIA ALÉRGENO-ESPECÍFICA

THAÍS PACHECO SOARES

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

Aprovada em 21 de fevereiro de 2018

Comissão examinadora:		
Dr. Gustavo Lazzaro Rezende (Doutor em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz)		
Dr. Milton Masahiko Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro)		
Dr. Bruno Lourenço Diaz (Doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz)		
Dra. Olga Lima Tavares Machado (Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; Professora orientadora desta tese)		

Agradecimentos

Este trabalho foi fruto do esforço de um grupo de pessoas, que ajudaram direta e indiretamente para a sua realização. Por isso agradeço:

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por proporcionar a realização do curso com excelência de qualidade;

À Universidade Médica de Vienna, Áustria, por me receber durante o estágio de doutorado sanduíche no exterior:

À minha orientadora Dr^a. Olga Lima Tavares Machado, por sua dedicação e ensinamentos;

Ao meu colaborador Dr. André de Oliveira Carvalho LFBM- UENF;

Aos meus Orientadores no exterior, Dr. Rudolf Valenta e Dr^a. Mirela Curri, do *Institute of Pathofisiology and Allergy Research* da Universidade Médica de Viena, Áustria:

À professora Fátima Ferreira que me recebeu no laboratório *Christian Doppler Laboratory for Allergy Diagnosis and Therapy*. Em Salzburg, Áustria, para um período de estágio;

A professora Carmem Galán que me recebeu em seu laboratório de Aerobiología na Universidade de Córdoba, Espanha, para um período de estágio;

As técnicas Jucélia Araújo do LQFPP- UENF e Renata Kiss- *Institute of Pathofisiology and Alergy Research*. Universidade Médica de Viena, Áustria, pela a ajuda auxiliar e amizade;

Todos os amigos do LQFPP- UENF e do *Ilnstitute of pPathofisiology and Aalergy Research*;

Ao apoio financeiro oferecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro;

À minha família, que foi o meu apoio psicológico e afetivo para que eu continuasse em frente;

Ao meu marido Chesil Batista, pelo companheirismo e por acreditar que eu conseguiria realizar esta etapa da minha vida;

A minha fé e perseverança, que nunca me desamparou e sempre me fez acreditar que eu seria capaz, até nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

1.0- INTRODUÇÃO	12
1.1 O Panorama das Doenças Alérgicas	12
1.2- Mecanismos de Resposta à Alérgenos: Uma Reação de Hipersensibilio	dade Imediata
	14
1.3- Ricinus Communis	17
1.3.2- O Desencadeamento da Alergia por Alérgenos de Ricinus communis.	21
1.4- Alternativas para tratamentos de alergia	26
1.4.1-Os medicamentos disponíveis no mercado	26
1.4.2- Imunoterapia alérgeno específica (ASIT), como alternativa profilática.	28
1.5- Novas estratégias para o desenvolvimento de ASIT	31
1.5.1- Peptídeos sintéticos contendo epitopos de células T	31
1.5.2- Peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes contendo epitopos de	
1.6- Estágios de desenvolvimento clínico de vacina para alergia	33
2.0- OBJETIVOS	35
2.1- Objetivos específicos:	35
3.0- MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Material Biológico	36
3.2 - Produção de recombinante Ric c 1 (rRic c 1)	37
3.3- Produção de Ric c 1 recombinante mutante (mrRicc1) - engenharia expressão	
3.5- Purificação das proteínas recombinantes rRic c 1 mrRic c 1	43
3.6 Caracterização de proteínas recombinantes (rRic c 1 e mrRic c 1) - imunodetecção	
3.7 Caracterização estrutural das proteínas recombinantes (rRic c 1 e mrRic	c 1) 45
3.7.1 Sequência N-terminal	45
3.7.2 Espectrometria de massa	45
3.8 Testes biológicos	46
3.8.1 ensaios inibitórios de α-amilases	46
3.8.2 Avaliação de perfil alergênico das proteínas recombinantes (rRic c 1 e	•
3.8.3 Seleção de pacientes alérgicos a diferentes fontes alergênicas pela pla MeDALL	
3.8.4- Seleção de soro de pacientes IgE- reativos a Ric c 1	49

3.8.5- ELISA- competição de IgE com soro dos pacientes IgE-reativos a Ric c 150
3.8.6- Investigação de reatividade a mrRic c 1 com soro de pacientes IgE-reativos a Ric c 151
4. RESULTADOS
4.1- Indução da Expressão de rRic c 151
4.3 -Purificação de rRic1 Por cromatografia de fase- reversa53
4.4- Expressão de Ric c 1 mutante (mrRic c 1)54
4.5- Purificação de Ric c 1 mutante (mrRic c 1) por cromatografia de fase- reversa e caracterização da fração purificada
4.6- Atividade biológica estrutura-dependente: Inibição de α-amilase59
4.7- Desgranulação de mastócitos e perfil de anticorpos produzidos durante a imunização em camundongos
4.8 -Avaliação do perfil de anticorpos produzidos no processo de imunização em camundongos BALB/C61
4.9-Manifestação Cutânea nos animais imunizados com o alérgeno natural 62
4.10- Seleção de pacientes alérgicos a diferentes fontes alergênicas pela plataforma MeDALL
4.11- Reatividade cruzada dos pacientes alérgicos a diferentes fontes de alérgenos com Ric c 1
4.12- ELISA- competição de IgE com soro dos pacientes IgE-reativos a Ric c 1 65
4.13- Reatividade de pacientes alérgicos a Ric c 1 com mrRic c 166
5- DISCUSSÃO:
6- CONCLUSÃO
7- REFERÊNCIAS
8- ANEXOS 82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Projeto Brasil Sem Alergia.
- Figura 2: Calendário polínico disponibilizado pela Rede Portuguesa de aeroalérgenos.
- Figura 3: Esquema ilustrativo da reação de Hipersensibilidade do tipo I.
- **Figura 4:** Representação gráfica da produção de mamona dos maiores produtores mundiais, 2010 a 2013.
- Figura 5: Dispersão de R. Communis na cidade de Campos dos Goytacazes.
- Figura 6: Representação esquemática da estutura terciaria de Ric c 1 e Ric c 3.
- Figura 7: Esquema da sequencia gênica e de aminoácidos de Ric c 1 e Ric c 3.
- **Figura 8:** Estrutura primária das isoformas de albuminas 2S de *R. communis*, Ric c 1 e Ric c 3.
- **Figura 9:** Esquema que demonstra os mecanismos de tolerância imunológica e clínica em ASIT.
- Figura 10: Vetor pET-32EK/LIC.
- **Figura 11:** Sequência dos iniciadores usados para a ligação da sequencia codificante de Ric 1 c ao vetor pET-32 EK/LIC.
- **Figura 12:** Sequencias proteicas e gênicas comparativas de Ric c 1 e Ric c 1 mutante.
- Figura 13: Mapa do vetor pMA fornecido pela Invitrogen.
- **Figura 14:** Imagem do SDS-PAGE demonstrando o aperfeiçoamento da padronização da expressão de rRic c 1.
- **Figura 15:** Visualização eletroforética da indução da expressão da proteína recombinante rRic c 1 com 1 mM de IPTG.
- **Figura 16:** Sobreposição dos cromatogramas de fase reversa em colunas C2/C8 em sistema HPL.
- **Figura 17:** Sequência de nucleotídeos de mrRic c 1, produzida por Invitrogene.
- **Figura 18:** Visualização eletroforética da Indução da expressão de mrRic c 1 por SDS- PAGE.
- **Figura 19:** Sobreposição dos cromatogramas de fase reversa em colunas C2/C8 em sistema HPLC.
- **Figura 20:** (A) Visualização eletroforética da mrRic c 1 após cromatografia em fase reversa em coluna C2/C8 em sistema HPLC.

- **Figura 21:** Visualização gráfica da inibição de enzimas α-amilases do intestino do inseto *Callosobruchus maculatus* pelas nRic c 1, rRic c 1 e mrRic c 1.
- Figura 22: Ensaio de desgranulação de mastócitos.
- **Figura 23:** Perfil de anticorpos produzido após imunização. Pre: soro coletado pré imunização.
- Figura 24: Manifestação cutânea nos indivíduos imunizados com Ric c 1+ Ric c 3.
- **Figura 25:** Análise das respostas cruzadas de 20 pacientes alérgicos (P1 a P20) a Ric c 1.
- **Figura 26:** Inibição do soro dos pacientes reativos a Ric c 1 (P6 e P9), com HRP, bromelaina (carboidratos) e Ric c 1 (alérgeno).
- **Figura 27:** Perfil das respostas dos pacientes IgE reativos a Ric c 1 (P6 e P9) quando expostos a mrRic c 1.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Caracterização dos diferentes receptores de histamina.
- **Tabela 2:** variações de tempo e concentração de IPTG.
- **Tabela 3:** Peptídeos identificados por espectroscopia de massa. Destacando, em vermelho, os resíduos de leucina que eram pontos de mutação.
- **Tabela 4:** Detecção da reatividade de IgE com Ric c 1 e mrRic c 1 em soro pacientes atópicos.

ANEXOS

Anexo I: Artigo aceito pelo periódico *Bioscience Reports* em 2018. A modified, hypoallergenic variant of the *Ricinus communis* Ric c1 protein retains biological activity.

Anexo II: Capítulo de livro publicado pela editora *Intech* em 2017. *Antihistaminic Treatment, Allergen-Specific Immunotherapy, and Blockade of IgE as Alternative Allergy Treatments.*

Anexo III: Consentimento do comitê de ética Animal concedido ao Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Anexo IV: Termo de consentimento aplicado aos pacientes voluntários doadores de sangue na Universidade Médica de Viena, Áustria.

RESUMO

A prevalência global das doenças alérgicas tem aumentado continuamente, e atualmente mais de 30% da população mundial é afetada. A imunoterapia alérgeno específica (ASIT, do inglês Allergen specific immunotherapy) a qual usa alérgenos recombinante é um dos poucos tratamentos alérgeno específico para doencas inflamatórias alérgicas. O alérgeno recombinante hipoalergênico pode ser produzido por mutação de epítopos de células B e T ou por alteração de epítopos de IgE, reduzindo a sua alergenicidade. Ric c 1, uma albumina 2S de R. communis, é um alérgeno encontrado em sementes e pólen. Ric c 1 pode reagir de forma cruzada com alérgenos de milho, trigo, soja, amendoim, camarão, peixe, poeira doméstica, tabaco e fungos aéreos, ampliando a preocupação e os riscos causados pelos alérgenos de R. communis. Dois epítopos contínuos de ligação à IgE foram identificados em Ric c 1, ambos epítopos continham dois resíduos de ácido glutâmico envolvidos na ligação de IgE e na reação alérgica. O objetivo deste trabalho foi procurar novas abordagens para o tratamento de alergias com base no desenvolvimento de vacina para ASIT usando alérgenos recombinantes hipoalergênicos, neste caso um hipoalergênico recombinante mutante de Ric c 1 (mrRic c 1). Para tanto, mrRic c 1 foi obtido por mutação em epitopos de ligação de IgE onde resíduos de Glu foram trocados por resíduos de Leu. . A sequência codificante sintética contendo estas alterações foi inserida no vetor de expressão pET-32 EK/LIC e clonados em E. coli. A alergenicidade de mrRic c 1 foi avaliada por ensaios de desgranulação de mastócitos: imunização de camundongos avaliando a produção de IgG1, total de IgG e IgE. A reatividade de Ric c 1 e mrRic c 1 em pacientes atópicos humanos também foi analisada. Nossos resultados demonstram que mrRic c 1 diminuíram a desgranulação de mastócitos de 75 a 25%, semelhante ao controle negativo, a imunização de camundongos com mrRic c 1 demonstrou que a produção de IgG1 se manteve em baixa concentração e a produção de IgG de bloqueio foi mantida na mesma proporção, quando comparado a proteína natural (Ric c 1) e mutante. Os pacientes que demonstraram reatividade para Ric c 1 não apresentaram respostas a mrRic c 1. Concluímos que nossos resultados demonstraram que esta estratégia para a produção de alérgenos mutantes hipoalergênicos (mrRic c 1) pode ser um passo importante no desenvolvimento de novas estratégias para ASIT.

Palavras Chaves: Ricinus communis, Hipoalérgeno, ASIT.

ABSTRACT

The global prevalence of allergies has been continuously rising, and currently more than 30% of the world population is affected. Allergen-specific immunotherapy (ASIT) which uses recombinant hypoallergenic allergens is one of the few allergen-specific treatments for allergic inflammatory diseases. Hypoallergenic recombinant allergen can be produced by mutating B- and T-cell epitopes or by altering IgE epitopes, reducing its allergenicit. Ric c 1, a 2S albumin from R. communis is an I allergen found in seeds and pollen. Ric c 1 can cross-react with allergens from corn, wheat, soybean, peanut, shrimp, fish, house dust, tobacco, and airborne fungi, amplifying the concern and the risks caused by R. communis allergens. Two continuous IgEbinding epitopes were identified in Ric c 1, both epitopes contained two glutamic acid residues involved in IgE binding and in allergic reaction. The aim of this work was to search new approaches for allergy treatment based on the development of vaccine for ASIT using recombinant hypoallergenic allergen, in this case a mutant recombinant hypoallergen of Ric c 1 (mrRic c1). For this, mrRic c 1 was obtained by mutating IgE binding epitopes (where the Glu residues were exchanged to Leu residues). The synthetic coding sequence containing the changes was inserted into a pET-32 Ek/LIC expression vector and cloned in E. coli. Allergenicity was evaluated by mast-cell degranulation assay; mice immunization assessing IgG1, total IgG and IgE production. The reactivity of Ric c 1 and mrRic c 1 in human atopic patients was also analyzed. Ours results shows that mrRic c 1 decreased mast-cell degranulation from 75 to 25%, similar to the negative control, the mice immunization with mrRic c 1 demonstrated that the production of IgG1 was maintained in low concentration and the blocker IgG was maintained in same ratio when compering the natural protein (Ric c 1) and the mutant. Patients who demonstrated Ric c 1 reactivity did not present response to mrRic c1. In conclusion, we demonstrated that this strategy for producing hypoallergenic mutant allergens (mrRic c1) might be an important step towards the developmento of new strategies for ASIT.

Keywords: *Ricinuns communis,* Hypoallergen, ASIT.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Panorama das Doenças Alérgicas

Alergia é uma reação exacerbada do sistema imunológico a determinadas substâncias. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 30% da população mundial, de todas as faixas etárias, são acometidos com algum tipo de alergia. No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (ASBAI, 2017), há cerca de 16 milhões de pessoas alérgicas. Os sintomas de alergias podem ser observados na pele e nas vias respiratórias e gastrointestinais, entretanto as manifestações sistêmicas podem incluir choque anafilático. Se uma alergia não é devidamente diagnosticada e tratada, tende a progredir para uma doença debilitante grave e crônica. (LINHART; VALENTA, 2012).

A Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (ASBAI, 2017), considera que entre os principais tipos de alergias as mais prevalentes são as vias respiratórias: rinites, rinoconjuntivites, sinusites e asma. As de pele também são de alta prevalência, principalmente as dermatites atópicas e as dermatites de contato (ASBAI, 2017). O desenvolvimento das doenças respiratórias alérgicas tem relação com fatores genéticos e ambientais. Rinoconjuntivite alérgica (RA) é um distúrbio alérgico na região do nariz e dos olhos, resultando em uma doença crônica, causando uma inflamação na mucosa nasal, rinite associada ou não a conjuntivite, é uma das alergias mais prevalentes no mundo, atingindo um quinto da população mundial. Os sintomas incluem coceira, espirros, secreção nasal aquosa e congestionamento nasal. Comumente, estão associados sintomas oculares (olhos lacrimejantes, vermelhos e com coceira). Os sintomas podem ser descrito como sazonais ou persistente; leve, moderado ou severo de acordo com sua influência na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (WANG et al., 2016). Os sintomas estão relacionados à exposição ao alérgeno, bem como as substâncias não específicas como fumaça, poeira, infecções virais, forte odores e ar frio. Hoje em dia os medicamentos disponibilizados no mercado visam o controle dos sintomas e a redução do processo inflamatório como, por exemplo: anti-histamínicos orais ou tópicos, intranasais e corticosteróides.

No entanto, essas terapias não alteram a resposta natural ao alergeno, sendo assim os pacientes permanecem a manifestar os quadros clínicos. Além

disso, também pode induzir efeitos colaterais. As Imunoterapias alérgenos Especificas (ASIT) com aplicação subcutânea (SCIT) ou sublingual (SLIT) podem não só dessensibilizar um paciente, melhorando os sintomas, mas também apresentam em longo prazo benefícios clínicos que podem persistir por anos após o tratamento (MEADOWS *et al.*, 2013).

No Brasil o projeto "Brasil sem alergia" associado a Cruz Vermelha Brasileira (Fig.1) O projeto foi desenvolvido no ano de 2007, e está distribuído em pontos fixos no estado do Rio de Janeiro: três na Baixada Fluminense (Duque de Caxias, Xerém e Nova Iguaçu), um em Realengo, na Zona Oeste do Rio, e uma unidade em Iguaba Grande, na Região dos Lagos, já realizou mais de 200 mil atendimentos gratuitos. Este é um projeto de ação social que possui assistencialismo, oferecendo esclarecimentos à população com intenção de promover a prevenção, combate e controle de todos os tipos de processos alérgicos e de doenças ligadas ao sistema imunológico. O projeto disponibiliza de testes alérgicos, atendimento médico, orientação clínica e exame de espirometria, além de imunoterapia (vacinas contra as alergias) a um baixo custo, além disso, possui associação com pesquisas científicas no âmbito da alergia em várias partes do mundo.



Figura 1 - Projeto Brasil Sem Alergia Fonte – www.brasilsemalergia.com.br

Iniciativas de controle das doenças alérgicas são vistas em todo mundo. Na Europa alguns paises participam da Rede Eropeia de Aeroalérgenos (EAN do inglês *European aerobiology network*), criada no final da década de 1980, que visa o monitoramento da qualidade do ar, quanto à disperssão de pólens de acordo com os períodos do ano. Estão envolvidos nessa iniciativa sobre a cooperação em dados de pólen os seguintes membros: Siegfried Jäger (Áustria), Paolo Mandrioli (Itália), Siwert Nilsson (Suécia), Marie-Roger Ickovich (França), Ritva Kupias (Finlândia), Peer Günther Von Wahl (Alemanha), Nicole Nolard (Bélgica) e Frits Spieksma (Países Baixos) (EAN., 2018).

Os dados de pólen foram, portanto, centralizados, desde o início, na cidade de Viena na Áustria. A rede foi hospedada pela Universidade de Viena e agora é hospedada pelo grupo de pesquisa Aerobiologia e Informações de Pólen na Universidade Médica de Viena. Em Portugal foi criada a Rede Portuguesa de aeroalérgenos, onde foi desenvolvido um calendário polínico (Fig.2) que é divulgado no sitio oficial. O calendário divulga para a população qual será a insidência dos pólens semanalmente (RPA., 2018). Com essa informação é possivel saber quais serão os pélens de maior dispersão, facilitando o controle ambiental para os indivíduoas alérgicos. A Espanha, por sua vez, desenvolveu a rede espanhola de areobiologia, com sua cede na Universidade de Córdoba, (REA, 2018) a rede espanhola conta com vários captores de pólen em diversas cidades espanholas e desta forma também é possivel fazer o monitoramento atmosférico de dispersão de pólen, sendo possível entender a sazonalidade das rinites alérgicas causadas por pólens.



Figura 2: Calendário polínico disponibilizado pela Rede Portuguesa de aeroalérgenos Fonte: www.rpaerobiologia.com

1.2. Mecanismos de Resposta à Alérgenos: Uma Reação de Hipersensibilidade Imediata

A reação alérgica envolve uma série de eventos que inicia com uma exposição do indivíduo a macromoléculas exógenas geralmente de fonte proteica, conhecido como alérgeno. Quando o alérgeno é internalizado no organismo as

células apresentadoras de antígenos (CAA), dentre estas os macrófagos ou células dendríticas (CD), internalizam o alérgeno que sofre proteólise, gerando fragmentos peptídicos conhecidos como epitopos. Os epitopos podem ser conformacionais, resultantes do arranjo estrutural da molécula ou contínuos, onde a sequência primária contínua é alergênica. Epitopos contínuos foram relacionados a processos de reações cruzadas entre alérgenos.

Os epitopos são expostos na membrana das CAAs pelo complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II do inglês *major histocompatibility class*) na forma de um peptídeo complexado ao MHC de classe II (D'AMATO, 2006) e reconhecidos pelos linfócitos T auxiliares (TH1 e/ou TH2 do inglês *T helper one or two*) que juntamente com os linfócitos B, iniciarão a resposta imunológica. As células TH2 são ativadas após o contato com CAA e produzem grandes quantidades de interleucinas (IL-4 e IL-5, IL-13). Os linfócitos B, por sua vez, são ativados à produção de Imunoglobulina E (IgE) a partir de três diferentes vias: 1- através da apresentação direta do antígeno pelo linfócito Th2; 2- ativação via citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 (IL-4, IL-13); 3- são ativados diretamente pelo antígeno, a partir da interação entre os receptores dos linfócitos B e os epitopos ligantes de células B do antígeno.

A patogenicidade da resposta alérgica pode ser mediada por 3 diferentes vias:1- diretamente pela produção de IgE; 2- mediada por um complexo de IgE e células T; 3- uma reação não medida por IgE, envolvendo apenas células T alérgeno específico (POMÉS, 2008). As reações alérgicas mediadas por IgE, são as mais comuns, conhecidas como respostas de hipersensibilidade imediata do tipo I.

Em uma resposta alérgica IgE-dependente, os anticorpos IgE, são capazes de se ligar a receptores Fcε presentes na membrana de mastócitos e basófilos. Esta ligação se caracteriza como sensibilização, ou seja, o primeiro contato do indivíduo com o alérgeno. No segundo e nos demais contatos do indivíduo com o mesmo alérgeno, ocorrerá uma ligação entre segmentos específicos do alérgeno (epitopos) e as IgEs presentes na membrana dos mastócitos e basófilos (HAMILTON; MACGLASHAN; SAINI, 2010). A interação entre os epitopos alergénicos IgE associada ao receptor FceRI da na membrana de mastócitos e basófilos é um evento chave na inflamação alérgica aguda. Esta interação induz mudanças fisiológicas e anatômicas que desencadearão a ruptura da membrana destas células

e a libertação imediata de mediadores inflamatórios (histamina e leucotrienos), que são responsáveis pelas manifestações mais comuns da hipersensibilidade do tipo I (Fig.3).

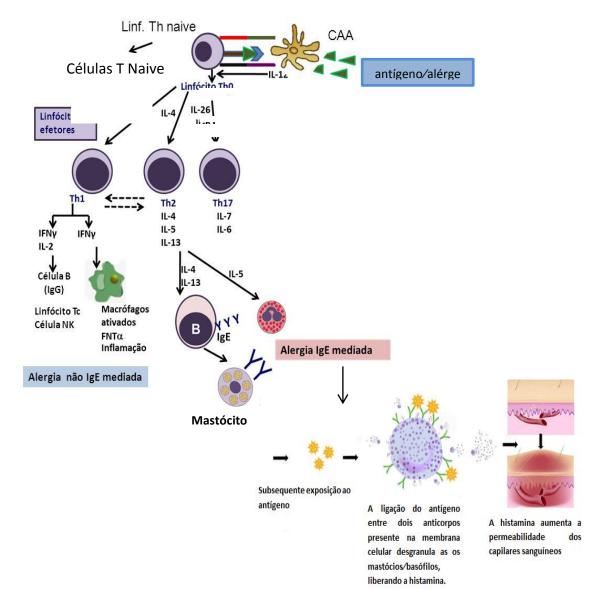


Figura 3 - Esquema ilustrativo da reação de Hipersensibilidade do tipo I

A reação alérgica envolve uma série de eventos que se inicia com o reconhecimento da estrutura do alérgeno por células apresentadoras de antígenos (CAA), os macrófagos (MC) internalizam o alérgeno que a seguir sofre proteólise, gerando fragmentos peptídicos, e liberando uma série de citocinas como IL-12, IL-6, IL-24e INFɣ. Estes peptídeos, denominados epitopos de célula T, são expostos na membrana das CAAs e reconhecidos pelos linfócitos T auxiliares (TH1 ,TH2, TH17) que juntamente com os linfócitos B, iniciarão a resposta imunológica. As células TH2 são ativadas após este primeiro contato com as CAAs e produzem grandes quantidades de interleucinas 4 e 5 (IL-4 e IL-5, respectivamente). Estas por sua vez atuam como citocinas e levam a biossíntese de IgE por linfócitos B. Em uma subsequente exposição ao alérgeno as IgEs ligada na superfície das células granuladas) mastócitos e ou basófilos) irão reconhecer o epitopo específico da proteína alergênica, levando a desgranulação celular e consequente liberação de mediadores inflamatórios.

De acordo com o Ministério da Saúde os principais agentes (alérgenos) que provocam alergias ou hipersensibilidades são: ambientais (fungos, ácaros, pólens, etc); alimentares (leite de vaca, ovo, soja, trigo, frutos do mar, amendoim, etc.); medicamentosas (antibióticos, anti-inflamatórios, contrastes radiológicos, hormônios, etc.); ou insetos (mosquitos, abelhas, vespas, marimbondos e baratas, etc.). As principais fontes de alérgenos inalantes são os ácaros domésticos, pólens, baratas e epitélios de animais. No Brasil, entre os aeroalérgenos de fonte vegetal destacamos *Ricicus communis*, que possui uma agricultura crescente, visto a aplicação industrial do seu óleo. Nos últimos 50 anos, tem-se detectado um aumento nos índices de doenças alérgicas respiratórias, este fato relaciona-se com alterações climáticas e a maior permanecia das pessoas em ambientes fechados e climatizados (OMS, 2018), além do aumento da agricultura de plantas com o potencial alergênico.

1.3. Ricinus Communis

Ricinus Communis (mamoneira) encontra no Brasil excelentes condições para o seu desenvolvimento, já que é uma planta de clima tropical e subtropical (AZEVEDO, 2007). O fruto da mamoneira é a mamona, e deste por processos industriais são extraídos o óleo, como produto principal, e a torta, como subproduto. O óleo de mamona tem como principal ácido graxo, o ácido ricinoléico ou 12-hidroxi-9-octadecenóico, que constitui 90% do óleo, os outros 10% são formados por ácidos graxos não hidroxilados, principalmente dos ácidos oléicos e linoleicos (OGUNNIYI, 2006). O óleo extraído das sementes de mamona possui um mercado internacional crescente, garantido por extenso número de aplicações que incluem o uso medicinal e em cosméticos, e a substituição do petróleo na fabricação de plásticos e lubrificantes. Ele tem ampla utilização na fabricação de tintas, sabões, vernizes, detergentes, carbono, velas, nylon, produtos sintéticos, papel plásticos, desinfetantes, adesivos, resinas isolantes (como as usadas em cabos telefônicos), colas especiais, tubos especiais para irrigação, cosméticos, lentes de contato, entre outras. Na medicina o óleo de mamona também apresenta ampla aplicação, sendo utilizado, inclusive, na fabricação de grande parte dos filtros hospitalares de hemodiálise, bombas corpóreas e extracorpóreas, prótese óssea de resina de mamona, material mais leve que a platina e que não apresenta o problema de rejeição, etc. O óleo de mamona tem como aspecto particular não mudar suas características físicas em altas ou baixas temperaturas e mesmo em variações bruscas de temperaturas, razão de sua imprescindível aplicação na aviação, como lubrificante de alta precisão, aditivos para tanques de combustíveis, sem o qual as aeronaves não decolariam (ABOISSAI, 2005).

Além das importantes aplicações do óleo de mamona citadas acima, uma série de estudos é realizada, para tornar viável o uso da mamona para a produção de Biodiesel. A produção de biodiesel a partir do óleo de mamona tornaria o plantio desta euforbiácea uma forma de gerar recursos e emprego em diversas regiões do Brasil. No cenário mundial, o Brasil é o terceiro maior produtor agrícola de mamona, ficando atrás apenas da Índia e da China (CORDER, 2016) (Fig. 4), porém, é considerado o segundo maior exportador mundial de óleo de mamona, perdendo o ranking apenas para a Índia.

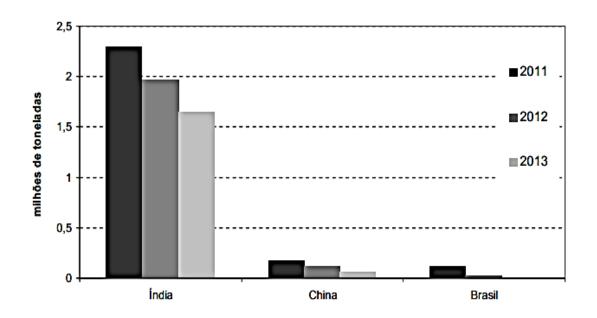


Figura 4 - Representação gráfica da produção de mamona dos maiores produtores mundiais, 2010 a 2013
Fonte: CORDER, 2016

Diversos programas governamentais no Brasil que visam incentivar a produção de biodiesel, incentivando o cultivo de oleaginosas que dependem diretamente de maior emprego de mão de obra, para garantir o aumento das taxas de empregados no Brasil e estimule regiões que estejam à margem do processo de

desenvolvimento econômico do país. Sendo assim, a mamona é vista como excelente alternativa, principalmente para a região Nordeste. Alguns programas são destacados no âmbito do governo federal: o "Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel - PROBIODIESEL", coordenado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia e o "Programa Combustível Verde", coordenado pelo Ministério de Minas e Energia. Na esfera estadual, principalmente nos estados no Nordeste brasileiro, os governos vêm desenvolvendo projetos que incentivam plantio e garantem isenção de impostos para os produtos dessa cadeia produtiva. Em função desses incentivos a previsão é de que deve haver um crescimento do agronegócio da mamona no país (BIODISELBR, 2018).

Segundo a Agência Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de Informação e Tecnologia a produção de mamona concentra-se principalmente na região Nordeste, preferencialmente no Semiárido. A produção de mamona é feita por pequenos produtores familiares, que fazem consórcio com culturas alimentares e que não utilizam cultivares melhoradas. Segundo a EMBRAPA (2018) há dois tipos de indústrias relacionadas com a cadeia produtiva da mamona: algumas processam a mamona obtendo o óleo/torta e outras utilizam o óleo como matéria-prima, sendo que as primeiras são em menor número em relação as segundas. O estado de maior área cultivada de mamona no Brasil é o Piauí seguido do Ceará, Rio grande do Norte, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (EMBRAPA, 2018).

O mercado de produção agrícola de mamona está no cenário econômico brasileiro e movimenta a economia. Algumas cidades brasileiras como Irecê no estado da Bahia tem sua economia voltada para o cultivo de mamona, com a finalidade de extração industrial do óleo sendo por tanto um dos principais produtores e exportadores de baga e óleo de mamona (CORDER, 2016).

A planta de *R. communis* é originada na África e, encontrou no Brasil facilidade adaptativa, por apresentar um clima propenso para seu desenvolvimento, a mamoneira é encontrada em quase todo território nacional, incluindo áreas urbanas, não se limitando, no entanto, apenas a áreas de agricultura. Na cidade de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro, onde foi desenvolvido este presente trabalho, a mamoneira é encontrada dispersa em áreas urbanas, rurais e de restinga (Figura 5).

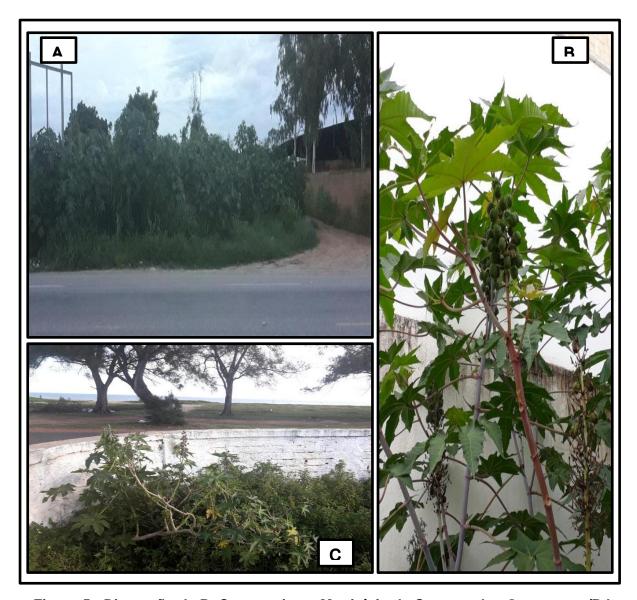


Figura 5 - Dispersão de R. Communis no Município de Campos dos Goytacazes/RJ A – Área rural no Distrito de Goytacazes; B- Área urbana no Bairro do Flamboyant; C- Área de restingano Distrito de Farol de São Thomé.

Fonte: Fotografias in loco da autora

Apesar das vantagens referentes ao uso do óleo de mamona na indústria, ocorre uma preocupação com o aumento do plantio. Quando o óleo é extraído resta um subproduto conhecido como torta da mamona que apesar de rica em nitrogênio, fósforo e potássio e proteínas, não pode ser utilizado como alimento, nem como aditivo em ração animal, pois suas sementes contêm substâncias tóxicas que não são extraídas ou inativadas pelos processos convencionais de extração do óleo. Os constituintes tóxicos da torta são a ricina, uma proteína, a ricinina, um alcalóide, e um conjunto de proteínas alergênicas muito ativas e resistentes aos processos

térmicos de desintoxicação (AZEVEDO, 2007). Entre as proteínas alergênicas, as isoformas de albuminas 2S (Ric c 1 e Ric c 3), são de baixo peso molecular e apresentam funções de reserva e de defesa. Além dos alérgenos encontrados na semente foi descrito a presença de isoformas de Albuminas 2S (RIc c 1 e Ric c 3) no pólen da mamoneira. Com o aumento do cultivo da mamoneira visando grande demanda comercial, aumentaria a sensibilização dos trabalhadores rurais, distribuidores da torta e da população que vive ao redor da plantação ou em torno das usinas de extração de óleo com os alérgenos de mamona.

1.4. O Desencadeamento da Alergia por Alérgenos de *Ricinus Communis*

As albuminas 2S são proteínas de reserva de dicotiledôneas, encontradas em sementes, frutos e pólen destas plantas. Elas são caracterizadas como os principais alérgenos de castanha do Pará, nozes, mostarda, gergelim e mamona (MORENO; CLEMENTE, 2008).

Essas albuminas são, em algumas espécies de plantas, proteínas ricas em metionina (KORTT et al., 1991; BEYER et al., 2002; HAGAN et al., 2003), enquanto em outras apresentam alto teor de glutamina (ODANI et al., 1983; BARCISZEWSKI et al., 2000). Elas apresentam massa molecular de 12-15 kDa, e geralmente são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas por duas pontes dissulfeto. As albuminas são encontradas na semente e mobilizadas durante a germinação, sendo descritas como doadoras de nitrogênio e enxofre para este processo (YOULE; HUANG, 1978).

As isoformas de albuminas 2S são os principais alérgenos em *R. communis*, e foram primeiro descritas por Spies e Coulson em 1943, que isolaram uma fração denominada CB-1A, com baixa massa molecular e estável em altas temperaturas (Spies 1974). Em 1978, Youle e Huang mostraram que CB-1A, era um alérgeno, e que estas proteínas estavam presentes em corpos proteicos nas sementes de mamona.

A estrutura primária de um dos alérgenos do conjunto CB-1A foi determinada por Sharief e Li (1982). Uma proteína de baixa massa molecular, com alto teor de glutamina, e composta de duas cadeias polipeptídicas, uma menor com 34 resíduos de aminoácidos (cadeia leve) e outra maior, com 61 resíduos (cadeia pesada), estas cadeias são ligadas por duas pontes dissulfeto. Hoje a proteína descrita por Sharief

e Li é conhecida como Ric c 1, uma outra proteína alergênica, também com baixa massa molecular e alto teor de glutamina foi identificada em *R. communis* ((DA SILVA et al., 1996). Esta proteína denominada inicialmente ASP-lb é hoje conhecida como Ric c 3, e assim como Ric c 1, apresenta duas cadeias polipeptídicas, cadeia leve com 41 resíduos de aminoácidos e a cadeia pesada com 67 resíduos, ligadas por duas pontes dissulfeto (Fig. 6).

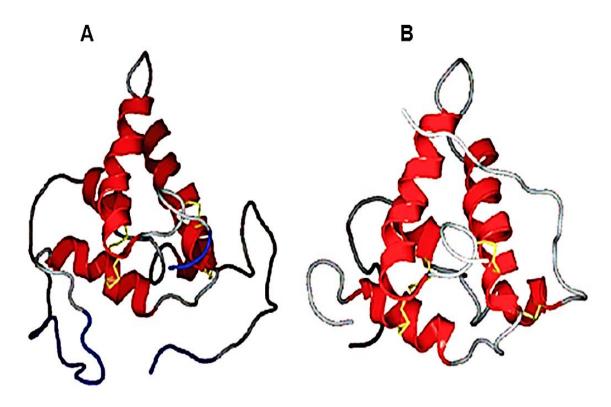


Figura 6 - Representação esquemática da estrutura terciaria de Ric c 1 e Ric c 3 A - Ric c 1 ; B - Ric c 3 . Em vermelho estão destacadas as α -hélices e em amarelo as pontes bissulfeto.

Fonte - Do NASCIMENTO et al., 2011

As isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são sintetizadas como um único precursor, com 237 resíduos de aminoácidos. O precursor sofre processamento pós-traducional, por endopetidases e carboxipeptidases, perdendo alguns fragmentos peptídicos para assim dar origem as isoformas, Ric c 1 e Ric c 3 (IRWIN et al., 1990). O gene da albumina 2S é conservado (Fig.7) entre diferentes cultivares de mamona e abundantemente expresso no endosperma, não sendo encontrado em tecido foliar (CHEN et al., 2004).

Α

gagtcaaagggtgaaagga ESKGERE S S S Q Q C R Q E V Q R K D L S S C E R ${\tt tacctgaggcaatcaagttca} agaagatcaccaggagaagaagtgttaaggatgcctgga$ Y L R Q S S S R R S P G E E V L R M P G gatgaaaaccagcagcaggagagccagcaactccagcaatgctgcaatcaggtaaagcaa D E N Q Q E S Q Q L Q Q C C N Q V K gtaagagatgaatgccaatgtgaagcaatcaaatatatcgcagaggatcagattcagcag V R D E C Q C E A I K Y I A E D O I O $\tt ggacagctacatggagaagagtctgaaagagtggcgcagagagcaggtgaaattgtatct$ G Q L H G E E S E R V A Q R A G E I V $\verb|tcttgcggtgtgcgttgcatgcgccaaactcgaacaaacccaagccagcaggggtgtcgt|\\$ S C G V R C M R Q T R T N P gggcagattcaagagcaacaaaatctcaggcaatgccaggaatatatcaaacaacaagtt G O I O E O O N L R O C O E Y I K O tccqqacaqqqaccaaqaaqaaqtqacaatcaaqaacqqtctcttcqtqqqtqctqtqac G P R R S D N Q E R S L R G C H L K Q M Q S Q C R C E G L R Q A I E caacagagccaggggcaacttcaaggtcaggatgttttttgaggctttcaggacagctgcg Q Q S Q G Q L Q G Q D V F E Aatttgccatcaatgtgcggcgtctcaccaaccgaatgccggtt-S M C G V S P T E C R

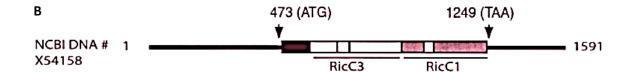


Figura 7 - Esquema da sequência gênica e de aminoácidos de Ric c 1 e Ric c 3

A: Sequência gênica e sequência de aminoácidos correspondentes. Azul refere-se à sequência de Ric c 3; vermelho a sequência de Ric c 1; preto peptídeos de ligação de Ric c 3 e Ric c 1 respectivamente. Representação esquemática da Fonte: própria autoria.

B: Posicionamento gênico de Ric c 3 e Ric c 1 no cromossomo. A Seta indica o início e o fim da tradução, os Códons referentes à ATG e TAA equivalem aos códons de início e de parada respectivamente. O trecho em branco equivale a região de Ric c 3 e o trecho em rosa equivalente a região de Ric c 1, os quadrados em destaque no meio das regiões equivalentes a Ric c 3 e a Ric c 1 equivale ao peptídeo de ligação entre as cadeias leves e pesadas, este peptídeo será hidrolisado pós tradução.

Fonte - Figura A: Própria autoria; Figura B: CHEN et al., 2004

Diversas funções de defesa para a planta vêm sendo descritas para as albuminas 2S incluindo a atividade antifúngica a inibição de proteases serínicas (GENOV et al., 1997) Em 2011 foi descrita a atividade inibitória da enzima α-amilase salivar e dos insetos *Tenebrio molitor*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*.(DO NASCIMENTO et al., 2011). De acordo com o banco de dados do Programa de Recursos de Pesquisa de Alergia Alimentar (FARRP, do inglês *food allergy research and resource program*) (Allergen, 2018) cerca de 33% de alérgenos

alimentares bem conhecidos possuem sequências de proteínas que se enquadram na família de inibidores de tripsina / α-amilase. Estas proteínas são evolutivamente relacionadas e têm uma arcabouço conservado de oito resíduos de cisteína, além disso, todos esses genes carecem de *íntrons* (CHEN *et al.*, 2004). Ric c 1 e Ric c 3 estão classificados na superfamília das prolaminas que formam 4 pontes dissulfeto. A presença do elemento estrutural CC e CXC não é comum em proteínas, o que facilita a identificação dos membros da superfamília das prolaminas, que possuem as α-hélices como principais componentes de estrutura secundária, apresentando um enovelamento conservado (DA SILVA *et al.*, 1996). Desta superfamília fazem parte também os principais alérgenos de plantas, que possuem baixa massa molecular, são estáveis a altas temperaturas e a proteólise, devido a sua estrutura estabilizada por pontes dissulfeto (WOODFOLK *et al.*, 2015).

As isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são descritas há muitos anos como proteínas alergênicas (DA SILVA *et al.*, 1996). Foram identificados seis epitopos, 2 em Ric c 1 e 4 em Ric c 3, responsáveis pelo desencadeamento da alergia (FELIX *et al.*, 2008) (Fig. 8). Segundo FELIX, nesses epitopos é importante que haja 2 resíduos de ácidos glutâmicos à uma distancia proximal, em média de 12 aminoácidos para ligarem às IgEs presentes na membrana dos mastócitos e/ou basófilos para assim, dispararem o processo de desgranulação destas células, ou seja, liberação de mediadores que levam aos sintomas da alergia. Foi demostrado que indivíduos sensibilizados com albumina 2S de mamona podem desenvolver uma resposta alérgica cruzada com Camarão, Peixe, glúten de trigo, Milho, Soja, Amendoim, Tobacco, poeira e fungo (DEUS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2011).

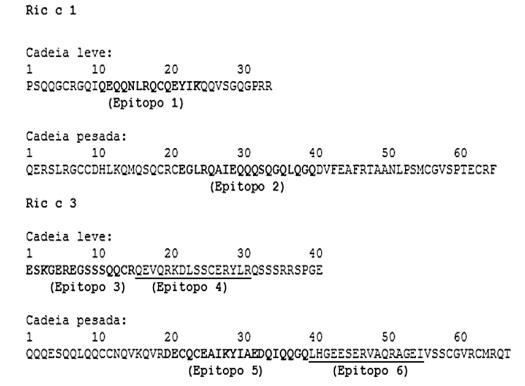


Figura 8 – Estrutura primária das isoformas de albuminas 2S de R. communis, Ric c 1 e Ric c 3

Estão destacadas as cadeias leve e pesada e os epitopos alergênicos de cada isoforma Fonte - FELIX et al., 2008

Estudos teóricos, por modelagem molecular, mostraram que é viável através de mutações dos resíduos de ácidos glutâmicos, por resíduos de leucina, tornar estas isoformas menos alergénicas e ainda assim manter sua atividade de inibição de α-amilases (DO NASCIMENTO *et al.*, 2011). As mutações nestes epitopos alergênicos não alterariam significativamente a estrutura destas proteínas, porém perderiam a capacidade de interação com a IgE e assim possivelmente não levaria ao desencadeamento dos sintomas da alergia.

1.5. Alternativas para Tratamentos de Alergia

Diversas alternativas para o tratamento de alergia estão sendo abordados e investigados em todo o mundo. Dentre as iniciativas para o tratamento da alergia destacamos: Medicamentos que visão a inibição da ação da histamina, os anti-inflamatórios que visam controlar inflamação tecidual local e o desenvolvimento de imunoterapias alérgenos específicas (ASIT) como uma medida profilática as doenças alérgicas. Os temas em questão serão expostos nas sessões seguintes deste trabalho.

1.5.1. Os medicamentos disponíveis no mercado

Os medicamentos com ação antialérgica disponíveis no mercado visam à inibição da ação da histamina, bloqueando a interação da histamina com os receptores de histamina. Os receptores de histamina são classificados em receptor do tipo HR1, HR2, HR3 e HR4 como descrito na tabela 1. Todos esses receptores pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs do inglês *G protein-coupled receptors*,). A ativação do HR1 estimula as vias sinalizadoras do fosfolipídio inositol, culminando na formação do inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3) e do diacilglicerol (DAG), levando ao aumento do cálcio intracelular, além disso, o HR1 (do inglês Histamine receptor), quando estimulado, pode ativar outras vias de sinalização intracelular, tais como a via da fosfolipase D e a da fosfolipase A. Recentemente demonstrou-se também que o estímulo do HR1 pode levar a ativação do fator de transcrição nuclear NFkB, estando ambos envolvidos nas doenças alérgicas (CRIADO, 2010).

Tabela 1 - Caracterização dos Diferentes Receptores de Histamina

Receptores de Histamina	Expressão Celular
HR1	Células neurais, músculo liso vascular e vias aéreas, endotélio, hepatócitos, células epiteliais, neutrófilos, eosinófilos, dendrócitos, monócitos, Linfócito T e Linfócito B
HR2	Neurônios histaminérgicos, eosinófilos, dendrócitos, monócitos, baixa expressão nos tecidos periféricos. Inibe a liberação e síntese da histamina
HR3	Neurônios histaminérgicos, eosinófilos, dendrócitos, monócitos, baixa expressão nos tecidos periféricos. Inibe a liberação e síntese da histamina
HR4	Alta expressão na medula óssea e células hematopoiéticas periféricas, e os., neutrófilos, dendrócitos, Linfócito T, basófilos, mastócitos; baixa expressão em tecidos periféricos, hepatócitos, baço, timo, pulmões, intestino e coração. Estimula quimiotaxia de eosinófilos e mastócitos

Fonte - CRIADO, 2010 e adaptado pela autora

Os anti-histamínicos são atualmente os medicamentos mais utilizados nos tratamentos de alergia. Estes fármacos, no entanto visam o alívio dos sintomas da alergia (WANG et al., 2016). Hoje os anti-histamínicos distribuídos podem ser divididos entre primeira e segunda geração. Sendo os de primeira geração: doxepina, difenidramina, pirilamina, clorfeniramina, hidroxibena, prometazina e ciproheptadina. Estes medicamentos são antagonistas dos receptores de histamina (H1) e apresentam diversos efeitos colaterais, pois atuam no sistema nervoso central, devido à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Os efeitos colaterais incluem sonolência, sedação e fadiga que podem levar à redução do desempenho cognitivo, psicomotriz e da memória (CHURCH; CHURCH, 2013). Com o avanço das pesquisas uma nova classe de anti-histamínico foi desenvolvida. Os antagonistas de HR1 de segunda geração que não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica com facilidade e têm maior afinidade com os receptores HR1, diminuindo seus efeitos sedativos em comparação com os medicamentos de primeira geração (CHURCH; CHURCH, 2013). Estes agentes anti-histamínicos incluem cetirizina, ebastina, epinastina, fexofenadina, loratadina, desloratadina, levocetirizina e rupatadina. Os anti-histamínicos de segunda geração causam menos

efeitos adversos. Porém, tantos os anti-histamínicos de primeira ou de segunda geração visam apenas mascarar os sintomas da alergia, não atuando na profilaxia ou tratamento das doenças alérgicas.

1.5.2. Imunoterapia Alérgeno Específica (ASIT) como Alternativa Profilática

A imunoterapia específica de alérgeno é baseada na repetida administração de alérgenos causadores de doenças com o objetivo de modificar a resposta do sistema imune em pacientes, para que doses mais elevadas do alérgeno possam ser toleradas. (MATSUOKA; SHAMJI; DURHAM, 2013) Originalmente, a alergia era considerada não como uma hipersensibilidade, mas sim como uma reação contra uma determinada toxina. Com base nessa ideia, em 1903, Dunbar imunizou animais com "toxinas de pólen". Os experimentos de Dunbar inspiraram, em 1911, Noon a vacinar pacientes alérgicos ao pólen de grama com essa toxina. Verificou-se que este tratamento reduziu os sintomas da alergia e a sensibilidade ao pólen de capim nos pacientes vacinados, e assim, Noon realizou a primeira imunoterapia alérgeno específica em pacientes alérgicos. (VALENTA et al., 2012).

Em 1911 iniciou o desenvolvimento de um tipo de terapia que utilizava os próprios alérgenos para o desenvolvimento da tolerância imunológica nos indivíduos sensibilizados (GERALDINI et al., 2008). Na história, o termo "dessensibilização" substituído pela abordagem "hipossensibilização". Na década de 1980, o termo "imunoterapia" tornou-se popular e a "imunoterapia específica" (SIT do inglês specific immunotherapy) é o termo mais comumente usado. Porém, este termo é mais adequado, quando há utilização de anticorpos monoclonais, por exemplo, contra a imunoglobulina E, pois de fato trata-se de uma imunoterapia específica (D'AMATO, 2006; RING; GUTERMUTH, 2011). Quando se trata da utilização direta de alérgenos como imunoterápicos o termo adequado é imunoterapia alérgeno específica (ASIT do inglês "Alergenspecific imuniterapy") (GARBANI et al., 2017; RING; GUTERMUTH, 2011).

A ASIT está associada a uma diminuição acentuada dos sintomas em pacientes alérgicos, melhorando a qualidade de vida destes. Os benefícios que são associados a este tipo de terapia podem ser vistos por diversos anos após o início do tratamento. ASIT demonstrou modular tanto a imunologia inata quanto à

adaptativa levando a uma tolerância imunológica do organismo. A tolerância imune pode desenvolver-se contra qualquer substância que o organismo é exposto. A falta de resposta tolerogênica pode levar ao desenvolvimento de uma série de doenças (HAMILTON; MACGLASHAN; SAINI, 2010). A geração de células T regulatórias (Treg) é o evento chave para o desenvolvimento da tolerância imunológica. A tolerância imunológica ocorre de forma periférica e específica, a tolerância periférica é iniciada pela secreção de IL-10 e TGF-β por células Treg específicas de alérgenos durante a exposição contínua. A indução de tolerância específica ao alérgeno está associada ao aumento das células que apresentam os marcadores CD3 + CD25 + de FOXP3 + na mucosa nasal (SACKESEN et al., 2013a). Os indivíduos atópicos possuem uma capacidade reduzida na proliferação de células Treg CD25 + e CD4, o que indica os mecanismos de falha a tolerância do alérgeno. O evento tolerogênico é marcado por uma mudança clonal de um perfil Th2 (alergênico) para um perfil Th1 (protetor). As células B são estimuladas pela ação da IL-10 a suprimir a produção de IgE e produzir IgG (particularmente IgG4) (BØGH et al., 2013), o que evita o desenvolvimento de sintomas alérgicos no indivíduo tolerogênico (Fig. 9) (AKDIS; AKDIS, 2014b; JUTEL; AKDIS, 2011; WAMBRE et al., 2014). A ASIT foi idealizada durante quase um século e continua a ser um dos poucos tratamentos antígenoespecíficos para doenças inflamatórias. Os mecanismos pelos quais a ASIT exerce os seus efeitos incluem a modulação de ambas as respostas de células T e de células B, consequentemente reduz a incidência e gravidade das reações adversas mediadas por IgE (LINHART; VALENTA, 2012). Abordagens para aprimorar este sistema incluem o uso de alérgenos recombinates modificados, novos adjuvantes e vias alternativas de administração. (FERREIRA et al., 2006; RING; GUTERMUTH, 2011; SHARMA et al., 2015; VALENTA; NIEDERBERGER, 2007; WAMBRE et al., 2014). A utilização de alérgenos recombinates para o desenvolvimento de imunoterapia vem ocorrendo por quase um século e continua sendo um dos poucos tratamentos alérgenos-específico para o tratamento de doenças inflamatórias oriundas da hiperssensibilidade imediata (CHEN et al., 2012; MRKIC et al., 2014; VALENTA et al., 2011, 2016; YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012). Os alérgenos recombinates são semelhantes ao tipo selvagem, equivalendo geralmente em sua estrutura e propriedades, porém com alterações em seus epitopos que não lhes garantem a capacidade de disparar o processo alergénico (FOCKE-TEJKL *et al.*, 2015; VALENTA; KRAFT, 1991; VALENTA; NIEDERBERGER, 2007)

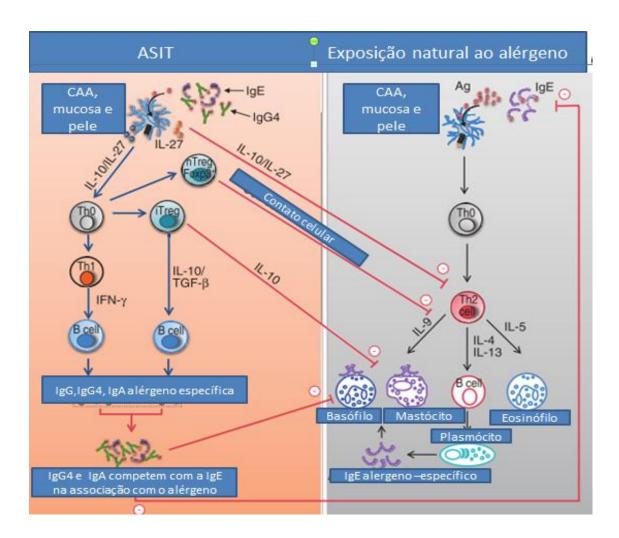


Figura 9 - Esquema que demonstra os mecanismos de tolerância imunológica e clínica em ASIT.

A exposição à alérgenos em baixa e repetida doses em superfícies mucosas em indivíduos atópicos conduz a apresentação de antígenos facilitada por IgE e a inflação alérgica imediata por Th2. O alérgeno em alta dose administrado por imunoterapia sublingual ou subcutânea resulta em desvio imune de uma resposta Th2 a Th1. Isso é acompanhado por um aumento na proporção de citocinas Th1 (IFN-γ, IL-12) para citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Há também uma indução de células reguladoras T [células Treg induzíveis (iTreg) e células Treg naturais (nTreg)] e um aumento nas citocinas reguladoras IL-10, TGF-β e IL-27 após imunoterapia que desempenham um papel importante na supressão das respostas de Th2 e contribuindo para a indução de IgA2 específica para alérgenos e em particular anticorpos de IgG4. Os anticorpos IgG4 são capazes de competir com IgE e assim suprimir a ativação de mastócitos e basófilos e inibir a apresentação facilitada por IgE de complexos de alergeno-IgE a células dendríticas e / ou células B.

Fonte - MATSUOKA; SHAMJI; DURHAM, 2013 e adaptado pela autora.

1.6. Novas Estratégias Para o Desenvolvimento de ASIT

A imunoterapia alérgeno específica (ASIT, do inglês *Allergen specific immunotherapy*), a qual usa alérgenos recombinantes, é um dos poucos tratamentos específico para doenças inflamatórias alérgicas. Nas sessões seguintes deste trabalho serão abordados as formas de desenvolvimento de ASIT descrito na literatura de referência esta tese.

1.6.1. Peptídeos sintéticos contendo epitopos de células T

Uma abordagem para células T alérgeno específicas para ASIT tem sido o uso de peptídeos sintéticos derivados de alérgenos contendo epítopos de células T. Estes peptídeos compreendem sequências lineares que representam fragmentos de alérgenos pequenos que se ligam ao receptor de células T específicas e não mostram reatividade com anticorpos IgE (WAMBRE et al., 2014). A imunoterapia utilizando pépticos tem algumas vantagens distintas, as vacinas que utilizam peptídeos de células T podem induzir células T reguladoras e reduzir resposta alérgica (CHAMPANA et al., 2016). Os peptídeos que contêm epitopo de células T são assim caracterizados por suprimirem a produção de IgE específica ao alérgenos, o que resulta na redução dos efeitos secundários adversos mediados por IgE. O tratamento é pensado para induzir a tolerância das células T através de células T reguladoras que secretam a citocina reguladora IL-10 (LARCHÉ; WRAITH, 2005; MATSUOKA; SHAMJI; DURHAM, 2013). Os fatores limitantes para o desenvolvimento desta terapia à base de células T são os variáveis repertórios de epítopo de células T, a alta taxa de efeitos colaterais sistêmicos e a incapacidade de induzir IgG de bloqueio específica ao alérgeno.

1.6.2. Peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes contendo epitopos de células B

Nos últimos anos, identificaram-se os epitopos de ligação de IgE de diferentes alérgenos (ZHENG *et al.*, 2011). Embora os alérgenos contenham epítopos conformacionais e seqüenciais, a importância da estrutura dos epítopos foi estabelecida (HAMILTON; MACGLASHAN; SAINI, 2010). Os anticorpos IgE sensibilizam os mastócitos ligando-se à superfície celular através de receptores de Fc de alta afinidade. A ligação cruzada de anticorpos IgE ligados a mastócitos por

antígeno (alérgeno) representa o sinal para a liberação de mediadores inflamatórios pré-formados e sintetizados recentemente e substâncias quimiotácticas, levando a reações alérgicas de tipo imediato (hipersensibilidade de tipo I) (WOODFOLK et al., 2015). Em geral, os anticorpos reconhecem epítopos conformacionais e lineares, mas são reunidos na superfície da proteína por dobragem da cadeia polipeptídica. A produção de IgE específicas de alérgenos requer a "ajuda" de linfócitos T específicos ao alérgenos, que são estimulados por fragmentos peptídicos lineares de antígenos. Estes peptídeos são criados por células apresentadoras de antígeno através do processamento de antígenos e são exibidos na superfície celular por moléculas do complexo MHC. Os clones de células T (TCC) são estabelecidos a partir de indivíduos. Os indivíduos atópicos com especificidade para alérgenos tendem a proliferação de T helper 2 (Th2) (alto nível de produção de IL-4 e IL-5), enquanto os indivíduos não atópicos tendem a proliferação de TCC do subconjunto T helper 1 (Th1) específico produzindo altos níveis de IFN-y (AKDIS; AKDIS, 2014b). Verificou-se que a imunoterapia específica bem-sucedida (ASIT) está associada a uma modulação da resposta imune aos alérgenos no nível das células Th2 para um perfil Th1 (AKDIS; AKDIS, 2014b). Os alérgenos recombinantes contendo epitopos de células B representam ferramentas promissoras para diagnóstico e terapia de alergia tipo I. O valor dessas moléculas para o diagnóstico foi avaliado em detalhes e um painel de alérgenos recombinantes está disponível para o diagnóstico de rotina de certas alergias inalantes (CHAPMAN et al., 2008; LUPINEK et al., 2014). O uso de alérgenos recombinantes contendo epítopos de células B para ASIT, por outro lado, sempre foi dificultado pela alta alergenicidade (capacidade de ligação de IgE) dessas moléculas, podendo leva a efeitos colaterais alérgicos durante o tratamento. Uma alternativa, no entanto, são as isoformas que diferem apenas em alguns aminoácidos (mutantes em aminoácidos específicos) gerando formas hipoalergênicas, estas serão diferencialmente reconhecidas pelo sistema imunológico humano e tendem a exibirem baixa alergenicidade, pois, obviamente, eles não possuem epítopos de IgE capazes de reconhecimento pelas IgEs que sensibilizam as células granuladas, mas mostram uma boa antigenicidade das células T como pré-requisito para a indução de tolerância (DOULADIRIS et al., 2015; FERREIRA et al., 1998, 2006; FOCKE-TEJKL et al., 2015; SHARMA et al., 2015; ZUIDMEER-JONGEJAN et al., 2015). Os alérgenos recombinantes

hipoalergênicos, no entanto, são semelhantes aos alérgenos de tipo selvagem, mas com alterações conformacionais nos epítopos de IgE, reduzindo sua alergenicidade. A injeção desses alérgenos recombinantes pode, portanto, modular a resposta imune alérgica ao nível da célula auxiliar T, mas com um risco substancialmente diminuído de efeitos colaterais anafiláticos durante o tratamento.

A tecnologia de DNA recombinante permitiu o avanço do campo de caracterização de alérgenos, assim como, a produção de derivados de alérgenos hipoalergênicos recombinantes bem definidos. Outro método de produção de uma variedade hipoalergênico envolve o uso de fragmentos de proteínas ou peptídeos relevantes associados ou não a fragmentos transportadores (VALENTA et al., 2011). O conceito de peptídeos contendo epitopos de células B unidos ao veículo transportador baseia-se no desenvolvimento de um hipoalérgeno recombinante, que deve eliminar os efeitos colaterais mediados pelas células T, já que é possível ser escolhidas moléculas transportadoras sem epítopos específicos de células T. Esta pode ser uma grande vantagem em comparação com o tratamento com peptídeos de células T, porque estes conduzem à ativação de células T específicas. São selecionados para esse propósito peptídeos derivados dos alérgenos com especificidade de ligação local a IgE, para induzir anticorpos de bloqueio de IgG. anticorpos IgE reconhecem preferencialmente conformacionais, é possível identificar peptídeos que fazem parte dos locais de ligação à IgE, mas não reagem com anticorpos IgE e, portanto, não induzem reações alérgicas mediadas por IgE. O alérgeno ligado ao veículo transportador deve, portanto, permitir a eliminação de efeitos colaterais, tanto de IgE como de células T mediadas, enquanto induzem IgG específica de alérgenos (CAMPANA et al., 2011; FOCKE-TEJKL et al., 2014; GIERAS et al., 2007).

1.6.3. Estágios de desenvolvimento clínico de vacina para alergia

O primeiro passo para o desenvolvimento de uma estratégia de vacina ou imunoterapia a partir de um alérgeno é a avaliação da importância clínica do mesmo para uma determinada população. Os critérios de seleção são definidos de acordo com a frequência de sensibilização, a relevância clínica, a magnitude das respostas de IgE e a extensão em que os epitopos de IgE estão representados em uma

determinada fonte de alérgeno ao usar experimentos de competição de IgE em diferentes populações (VALENTA; NIEDERBERGER, 2007).

Segundo Vallenta *et al.* (2016) o desenho das estratégias de vacinação para alergia é o seguinte:

- Descoberta in vitro de antígenos (alérgeno) relevante para uma determinada população;
- 2- Conhecimento estrutural do alérgeno envolvido;
- 3- Produção recombinante do alérgeno, com ou sem alterações genéticas, vide cada alérgeno em questão;
- 4- Estudo clínico em animais;
- **5-** Ensaios clínicos de vacinas: com humanos. Este processo envolve princípios éticos rigorosos de consentimento e utiliza-se voluntários informados;
- 6- As análises de segurança de vacinas, imunogenicidade e eficácia.

Para Strategies (1995) as fases para o desenvolvimento de vacinas são:

Fase I - Ensaios em pequena escala de pacientes para avaliar se a vacina é segura em humanos e qual resposta imune ela é capaz de induzir.

Fase II - Ensaios em grande escala para avaliar a eficácia da vacina, os efeitos colaterais e as respostas imunes. Nesta fase também se avalia a eficácia e segurança em populações selecionadas de pacientes imunossuprimidos e idosos. Os objetivos nesta etapa são definir a dose-resposta, tipo de paciente, freqüência de dosagem e numerosas outras características de segurança e eficácia.

Fase III - Amplitude do grupo de estudo, introduzindo em diferentes populações.

Fase IV - Licenciamento e introdução no mercado e vigilância pós-comercialização Visa detectar efeitos adversos raros, bem como avaliar a eficácia a longo prazo.

A avaliação da vacina pré-licenciamento ocorre nas fases I-III. Sua eficácia é determinada pela porcentagem de redução na incidência da doença (vacinado versus não vacinado), também é avaliado seu tempo de validade, complexidade, custo e limitações da validade. Na fase pós-licenciamento (fase IV) é avaliado a capacidade protetora de uma vacina em relação à doença alvo em populações, é uma visão do "mundo real" de como uma vacina (que talvez já tenha provado ter alta eficácia) reduz a doença em uma população. Avalia-se o equilíbrio líquido dos

benefícios e os efeitos adversos de um programa de vacinação (VALENTA *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

Desenhar um variante mutante hipoalergênico de Ric c 1 pela troca dos ácidos glutâmicos nos epítopos alergênicos por leucinas, obter a Ric c 1 mutante de modo recombinante e comprovar sua hipoalergenicidade.

2.1. Objetivos Específicos

- 1. Indução da expressão de rRic c1;
- Desenho e compra do gene sintético de Ric c1 contendo as mutações (GLU-LEU) nas posições sugeridas pela literatura;
- Clonagem da construção plasmidial pMA mRic c1 em cepa de clonagem XL-10;
- 4. Clonagem da construção plasmidial pET mRic c1 em um sistema de expressão bacteriano *E. coli* ;
- 5. Purificação das proteínas recombinantes rRic c 1 e mrRic c 1;
- Sequenciamento amino terminal de rRic c 1 e mrRic c 1;
- Espectrofotometria de massas de mrRic c 1, a fim de confirmar as mutações nos aminoácidos de interesse;
- Ensaios de inibição de α-amilase com os variantes de Ric c 1 natural (nRic c 1), recombinante (rRic c 1) e mutante recombinante (mrRic c 1), para confirmar a manutenção da estrutura terciária de rRic 1 e mrRic c 1;
- Ensaio de desgranulação de mastócitos de rato, com as variantes nRic c 1, r
 Ric c1, mrRic c 1;
- 10. Imunização em camundongos Balb/c com os variantes nRic c 1 e mrRic c 1
- 11. Seleção de pacientes IgE-reativos à Ric c 1;
- 12. Análise da reatividade à mrRic c 1, dos pacientes selecionados IgE-reativos à Ric c 1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

- As sementes de R. communis L., cultivar IAC-226 foram obtidos do Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brasil.
- As células da cepa de *E. coli* Rosetta-gami2 (DE₃) pLysS (genótipo: Δ(araleu)7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL(DE3)
 F'[lac⁺ lacl^q pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R) foram adquiridas comercialmente da empresa Novagen.
- As células de *E. coli* cepa JM109 (genótipo: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F´traD36, proAB, laql^qZΔM15]) foram adquiridas comercialmente da empresa Promega.
- As células de *E. coli* ultracompetentes cepa XL-10 Gold (Tet^rΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacl^qZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]) foram adquiridas comercialmente da empresa Novagen
- O soro dos ratos isogênicos R/A Tor e dos ratos Wistar foram obtidos da unidade animal da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Já os soros dos camundongos Balb/c foram obtidos na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal desta universidade (Proc. CEUA-UENF/297). Os animais foram imunizados com o pool de albumina 2S e os soros foram separados como descrito por Felix et al. (2008).
- Os soros humanos foram obtidos e toda parte experimental foi desenvolvida na Universidade Médica de Viena na Áustria sobe orientação do professor Dr. Rudolf Valenta. Todos os procedimentos experimentais estavam de acordo com o comitê de ética da citada Universidade (número de protocolo não fornecido).
- O pool de proteínas alergênicas de mamona, Albuminas 2S, e Ric c1 natural foram isolados de sementes de mamona conforme descrito por Pacheco-Soares et al 2018 "in press", anexo 1. Este material foi obtido durante a dissertação de mestrado (PACHECO-SOARES, 2014).

3.2. Produção de recombinante Ric c 1 (rRic c 1)

Para servir de controle nos experimentos de atividade biológica para determinação de hipoalergenicidade rRic c 1 foi obtida de modo recombinante e cujo processo de produção foi melhorado em relação ao método desenvolvido por Pacheco-Soares (PACHECO- SOARES, 2014). Para tanto, expressar Ric c 1 em um sistema de expressão bacteriano, é necessário primeiro ligar sua região codificante em um vetor de expressão. Foi utilizado o vetor de expressão pET-32 EK/LIC (Novagem) (Fig. 10).

Este vetor possui características particulares importantes para que ocorra a produção da proteína de interesse: gene lac 1 que codifica a proteína repressora lac; um promotor T7 específico para a enzima T7 RNA polimerase; um operador lac responsável pelo bloqueio da transcrição; um sítio de policlonagem; uma origem de replicação e um gene de resistência a um antibiótico; além dessas características o vetor possui uma sequência de nucleotídeos que adicionará à proteína expressa uma sequência de histidinas consecutivas, que dará a proteína recombinante uma distinção entre as outras proteínas expressas. As proteínas recombinantes neste vetor são ainda fusionadas à tioredoxina, que ajuda na solubilidade da proteína recombinante e ajuda a evitar a formação de corpos de inclusão.

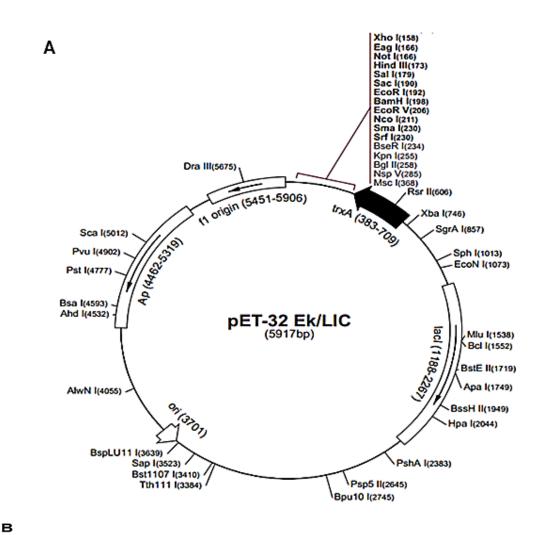




Figura 10 - Vetor pET-32EK/LIC.

A) Mapa do vetor pET-32EK/LIC; B) Detalhamento da região do sítio de policionagem onde a sequência codificante do gene de interesse é inserida no sítio LIC.

pET-32 EK/LIC

Fonte - Novagen pET system manual

O sistema independente de ligação (LIC do inglês *ligation independent cloning*) facilita ao processo de clonagem, pois não há a necessidade de digestão com enzima de restrição ou de reação de ligação. Para a clonagem no vetor pET-32 EK/LIC foram desenhados manualmente os iniciadores (Fig.11) (PACHECO-SOARES, 2014), inserindo aos iniciadores previamente descritos, uma sequência de nucleotídeos necessária para a incorporação da região codificante de Ric c 1 ao vetor pET-32 EK/LIC. Foi realizado então uma reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês *polymerase chain reaction*) a fim de amplificar a região gênica de Ric c 1 contendo sequências em suas extremidades que facilitarão a incorporação ao vetor pET-32 EK/LIC (PACHECO-SOARE, 2014). Suas temperaturas de anelamento, assim como sua capacidade de auto complementaridade e porcentagem de C/G foram analisadas no sítio NCBI (*primer blast*).

Ric c 1

iniciador 5'-3' (pET s)

5' GACGACGACAAGATGCCAAGCCAGCAGGGGTG3'

Tm: 69,73 °C, CG: 64% iniciador 3'-5' (pET as)

3' GTTGGCTTACGGCCAAGATT**TGGCCCGAAGAGGAG**5'

Tm: 68,89 °C, CG: 58,33%

Figura 11 - Sequência dos iniciadores usados para a incorporação da sequencia codificante de Ric 1 c ao vetor pET-32 EK/LIC.

Em negrito é mostrado em ambos os iniciadores a sequência que anela com o vetor. O ATG destacado em itálico e sublinhado no inciador pET s foi adicionado como um requerimento para se clonar no vetor pET-32 EK/LIC. Abaixo de cada iniciador é mostrada a Tm e a porcentagem de CG.

Fonte - PACHECO-SOARES, 2014

Após a PCR foi feito o anelamento do produto amplificado com o vetor pET-32 EK/LIC da seguinte forma: 1 μ g de produto de PCR foram incubados com tampão T $_4$ DNA polimerase 1x, ATP 25mM, DTT 1 mM, T4 DNA polimerase 0,1 u/μ L e o volume de 10 μ L foi completado com água ultrapura. Toda reação foi incubada a 22 °C por 30 min e inativada a 72 °C por 20 min. Depois do tratamento com a T $_4$ polimerase o fragmento encontra-se pronto para anelamento ao vetor. Para a reação de anelamento 12ng/ μ L do vetor pET-32 EK/LIC e 2 μ L do produto de reação do

fragmento tratado com a T_4 polimerase equivalente a 100 ng/ μ L, foram incubados por 5 min a 22 °C, em seguida adicionado 25mM EDTA, 1 μ L de água ultrapura e uma nova incubação nas mesmas condições anteriores.

O vetor incorporado ao fragmento gênico foi utilizado para transformar um sistema bacteriano (*E. coli* JM 109) para sua manutenção. A transformação e a extração do plasmídeo seguiram como descritas anteriormente. Para verificar se o fragmento foi devidamente clonado, o plasmídio extraído foi submetido a uma digestão com as enzimas *Bgl* II e *Eco* R I. Para tanto se adicionou 0,5u/μL de cada enzima, tampão tango [2x], 0,5 μg/μL do plasmídio extraído e 11 μL de água ultra pura até um volume final de 20 μL. A reação foi incubada a 37 °C por 1 h, e posteriormente a digestão foi visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Após comprovar que o fragmento foi devidamente clonado, o plasmídio extraído está pronto para transformar uma cepa de superexpressão.

A célula hospedeira *E. coli* Rosetta gami2 (DE3) pLysS usada para expressão possui o gene da T7 RNA polimerase, e o operon lac em seu genoma. Desta forma, quando a molécula de IPTG (Isopropil-β-D-galactosídeo) está presente dentro da célula, a transcrição da T7 RNA polimerase é ativada. Adicionalmente esta linhagem possui um vetor (pRARE) que codifica códons para RNA transportadores que não são usados pela *E. coli* para evitar interferir no processo de produção recombinante por interrupção prematura da tradução pela ausência de reconhecimento entre o RNA mensageiro e o RNA transportador. O processo de transformação seguiu como descrito anteriormente (PACHECO-SOARES, 2014).

As células de Rosseta gami2 (DE₃) pLysS transformadas com a construção pET Ric c 1 (PACHECO-SOARES, 2014). Foram retiradas do estoque a -70°C e cultivadas em meio LB contendo ampicilina (100 μg/mL) e cloranfenicol (34 μg/mL). As cepas foram mantidas a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Após o crescimento foi retirado 300 μL da cultura e adicionado10 mL de meio LB contendo os antibióticos. As culturas foram igualmente divididas (5mL) e em uma da duplicata foi adicionado 1 mM IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) para ativar o processo de indução da tradução de Ric c 1r,e as culturas que não possuíam IPTG foram avaliadas como controles.

Estratégias para aprimorar o rendimento da produção da proteína recombinante foram estabelecidas nesse trabalho, para tanto foram variadas as

concentrações de IPTG (0,5mM e 1mM) e o tempo de indução (3h e 16 horas) de dois clones distintos de Rosseta gami2 (DE₃) pLysS contendo construção pET-Ric c 1 (Tabela 2).

Tabela 2 - Variações de Tempo e Concentração de IPTG

Clone 1		Clone 2	
A 1mM IPTG	B 1mM IPTG	a 1mM IPTG	b 1mM IPTG
3h de indução	16h de indução	3h de indução	16h de indução
C 0,5mM IPTG	D 0,5mM IPTG	c 0,5mM IPTG	d 0,5mM IPTG
3h de indução	16h de indução	3h de indução	16h de indução

Fonte – Elaborado pela autora

3.3. Produção de Ric c 1 Recombinante Mutante (mrRicc1) - Engenharia, Clonagem e Expressão

Para a produção de uma variante hipoalergênica de Ric c 1 para confirmação da hipoalergenicidade em testes biológicos foi produzida a mrRic c 1. A sequência do gene Ric c 1 de *R. communis* foi fornecida por GenBank (NW_002994404.1) e códons específicos para resíduos de ácido glutâmico foram mutados para códons de resíduos de leucina. Apenas um dos dois resíduos de ácido glutâmico em cada epítopo de alergeno foi mutado (fig.12).

A - Ric c 1 Natural e sua sequência de aminoácidos e de nucleotídeo

B - Ric c 1 mutante e sua sequência de aminoácidos e nucleotídeos (gene sintético)

Figura 12 - Sequencias proteicas e gênicas comparativas de Ric c 1 e Ric c 1 mutante. A **-** Sequência de Ric c 1 e da sequência codificante natural sem mutações, destacando em negrito os resíduos de E, que estão dentro dos epitopos alergênicos, e com (+) o resíduo de E que interage com a α-amilase em seu sítio ativo, inibindo-a. B - Sequência de Ric c 1 e da sequência codificantes sintética destacado em negrito os resíduos mutados de E por L; destacados em negrito e itálico os resíduos de E preservados; destacado com (+) o resíduo de E que não podem ser alterados por estarem envolvidos na inibição de α-amilase. As sequências dos epitopos alergênicos, tanto em aminoácidos quanto em nucleotídeos estão sublinhados e as caixas cinzas indicam as sequências tanto em aminoácidos quanto em nucleotídeos de ligação da cadeia leve com a pesada.

Fonte – própria autoria

Os resíduos de ácido glutâmico envolvidos na inibição da α -amilase, como predito pelos estudos "in silico" (DO NASCIMENTO *et al.*, 2011), foram conservados. A ferramenta GeneArt foi utilizado para a síntese. O gene sintético foi produzido, sequenciado e clonado no vetor de clonagem pMA-T (fig13) pela empresa Invitrogen. A construção pMA-T-mrRic c 1 foi transformado na estirpe XL-10 de E. coli por choque térmico (PACHECO-SOARES, 2014) para propagar e conservar esse vetor em um sistema biológico. Os clones transformados foram crescidos em meio sólido LB contendo 100 μ g / mL de ampicilina e 34 μ g / mL de cloranfenicol. As colônias foram coletadas e crescidas em meio LB líquido com os mesmos antibióticos, e as células XL-10 transformadas foram estocadas a -70 °C até serem necessárias.

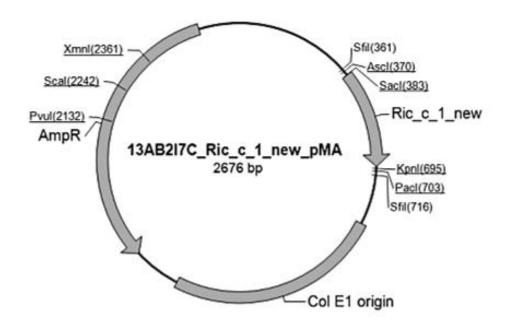


Figura 13 - Mapa do vetor pMA fornecido pela Invitrogen

Fonte - GeneArt® Cloning Vectors - Invitrogen

A construção pMA-T-mrRic c 1 foi usada como molde para uma PCR para amplificar ao sequência codificante de mrRic c 1 inserindo as regiões que se ligam ao vetor de expressão pET-32 EK/LIC. As condições da PCR, as sequências de iniciadores e o anelamento no vetor pET-32 EK/LIC foram as mesmas descritas acima. A cepa de expressão E. coli Rosetta-gami2 (DE3) pLysS foi utilizada para expressão. Todo os processos metodológicos para a transformação das células competentes e a expressão funcional de mrRic c 1 seguiu exatamente como descrito anteriormente para rRic c 1.

3.4. Purificação das Proteínas Recombinantes rRic c 1 mrRic c 1

A purificação de Ric c 1r foi realizada por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC em coluna μPPC C2/C18 ST 4.6/100. Inicialmente, amostras de nRic c 1, foram utilizadas para padronização da coluna. Os eluentes empregados foram a solução A: 2% de acetonitrila (ACN) contendo 0,1 % de ácido trifluor acético (TFA) e a solução B: ACN 80% contendo TFA 0,1%. O gradiente de eluição foi de 0 a 100% de solução B em 50 minutos e o fluxo foi de 0,7mL/min. Após a determinação do tempo de retenção de Ric c 1 (utilizando amostra padrão conhecida), 500μL do extrato total da indução foi submetido ao processo cromatográfico e o fracionamento

foi acompanhado por leituras de absorvância a 220 nm empregando um detector de arranjo de iodos (Diodo array entre 200 a 300 nm).

O material resultante da indução contém a cauda de histidina e a tiorredoxina, portanto, deveria eluir com tempo de retenção diferente de Ric c 1 isolada diretamente da semente. Foi feito um acompanhamento dos espectros de absorção dos picos obtidos e todos os picos protéicos foram coletados e analisados por SDS-PAGE. O pico majoritário foi coletado, concentrado por liofilização e submetido à clivagem enzimática com endoproteinase EK de acordo como manual de instrução (Sigma-Aldrich). Após a clivagem, 500µL deste hidrolisado foram novamente aplicados à coluna C2/C18 de fase reversa e o pico com o tempo de retenção correspondente ao do padrão de Ric c 1, foi coletado e liofilizado.

3.5. Caracterização de Proteínas Recombinantes (rRic c 1 e mrRic c 1) - SDS-PAGE e Imunodetecção

As células que sofreram indução das proteínas recombinantes (rRic c 1 e mrRic c 1) foram sedimentadas por centrifugação (15 000 xg durante 10 min), ressuspensas em tampão de fosfato (fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM) e lisadas por adição de 5ML CelLytic B (Sigma-Aldrich) na presença de um coquetel de inibidores de protease (Sigma). O lisado celular foi submetido a centrifugação (15 000 xg durante 10 min). A expressão de rRic c 1 e mrRic c 1 foi inicialmente analisada por 15% SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). O lisado bacteriano não purificado (15 μL), incluindo a proteína expressa e todas as proteínas de *E. coli*, e 15 μL da cultura bacteriana foram submetidos a SDS PAGE a 15%. A presença de rRic c 1 ou mrRic c 1 na fração induzida foi confirmada pelo Western Blot (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). O gel SDS-PAGE foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e transferido num sistema semi seco de papéis de filtro embebidos em tampão de transferência (Tris 20 mM, glicina 145 mM, metanol a 20%) sob uma corrente de 1 mA por cada cm2 de membrana por 2 h. A membrana foi então embebida em 5 mL de tampão de bloqueio (Na₂HPO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M, 2% de leite em pó desnatado) durante 1 h. O tampão de bloqueio foi trocado, e adicionado o anticorpo primário policlonal anti- albumina 2S de mamona gerada em coelhos. A membrana foi incubada com o anticorpo policional primário a 4 ° C durante 18 h. A membrana foi lavada 10 vezes durante 5 min cada em PBS (Na₂HPO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M). A membrana foi então incubada com o anticorpo

secundário, um anti-IgG gerado coelho conjugada com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluída com tampão de bloqueio. A reação colorimétrica de todas as bandas foi desenvolvida com uma mistura de substrato de 5 mg de de 3,3'-diaminobenzidina DAB em 4,9 mL de água, 300 mL de imidazole 0,1 M, 100 mL de tampão Tris-HCl 2 M (pH 7,5) e 5 mL de H_2O_2 a 30%.

3.6. Caracterização Estrutural das Proteínas Recombinantes (rRic c 1 e mrRic c 1)

A caracterização estrutural das proteínas recombinantes rRic c1 e recombinantes mutantes mrRic c 1 foram desenvolvidas por sequenciamento N- terminal utilizando a metodologia de Edmam e espectrometria de massas. Para tanto o detalhamento de tais metodologias serão apresentados nas sessões seguintes desta tese.

3.6.1. Sequência N-terminal

Foi realizado o sequenciamento da sequência N-terminal parcial de Ric c 1r após a clivagem enzimática com EK, purificada pela segunda estratégia de purificação (cromatografia de fase reversa). O sequenciamento foi realizado segundo a metodologia de Edman usando um PPSQ-33A *Protein Sequencer* (Shimadzu), a qual compreende ciclos de reação com 3 etapas: 1) Reação da proteína com fenillisotiocianato (PITC do inglês *phenylisothiocyanate*), que se acopla ao grupo amino NH₂ livre do aminoácido 1; 2) Hidrólise ácida da proteína conjugada com PITC libera a feniltiohidantoína (PTH do inglês *phenylthiohydantoin*) do aminoácido 1 e o restante da proteína, tornando o aminoácido 2 o novo resíduo N-terminal e 3) Análise cromatrográfica do PTH-aminoácido, por sobreposição do tempo de retenção com um padrão conhecido de PTH de todos os aminoácidos e novo ciclo de reação com o novo N-terminal da proteína.

3.6.2. Espectrometria de Massa

Para a determinação da estrutura primária das proteínas Ric c 1 recombinante e Ric c1 recombinante mutante por espectrometria de massa foi utilizado um espectrômetro de massa Synapt G2-Si HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido). As amostras foram carregadas em uma coluna C18 nanoACQUITY UPLC 5 μ m (180 μ m x 20 mm) a 5 μ L / min durante 3 min e depois em uma coluna de fase reversa analítica nanoACQUITY HSS T3 de 1,8 μ m (100 μ m × 100 mm) a uma taxa de fluxo

de 500 nL / min. Os peptídeos foram eluídos usando um gradiente binário, com a fase móvel A consistindo em água (Tedia, Fairfield, EUA) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich) e a fase móvel B consistente em ACN (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich). A sequência de gradiente foi de 7-40% de B de 0 a 33,21 min, 40-85% de B de 33,21 a 37,21 min, 85-85% de B de 37,21 a 41,21 min e 85-7% de B de 41,21 a 43,21 min. A espectrometria de massa foi realizada em modo de resolução positiva (modo V) e no modo de aquisição independente de dados. A energia de colisão de transferência aumentou de 20 a 35 V em modo de alta energia, as voltas de cone e capilar foram de 30 e 2800 V, respectivamente, e a temperatura da fonte foi de 60 ° C. As taxas de varredura de aquisição espectral foram definidas para 0,5. Foi utilizado o padrão [Glu1] -fibrinopeptídeo humano (Sigma-Aldrich) a 100 fmol / μL como padrão de calibração externo. O processamento espectral e as buscas de banco de dados usaram o Protein Lynx Global Service v.3.02 (Waters) com os seguintes parâmetros: Min Fragment Ion Matches per Peptide, 2; Min Fragment Ion Matches por Protein, 5; Escavações perdidas, 2; Reagentes modificadores corrigidos por carbamidometilo, C; e oxidação do reagente modificador variável, M.

3.7. Testes Biológicos

Os ensaios biológicos que comprovam a manutenção estrutural assim como hipoalergenicidade de mrRic c1 foram avaliadas por ensaios de inibição de α-amilase; desgranulação de mastócitos; imunização de camundongos, avaliando a produção de IgG1, IgG e IgE. A reatividade de Ric c 1 e mrRic c 1 foi avaliado em pacientes atópicos humanos europeus. Os processos que descrevem estas metodologias seguem nas sessões seguintes.

3.7.1. Ensaios Inibitórios de α-amilases

As larvas do besouro *Callosobruchus maculatus* foram dissecadas e seus intestinos, acompanhado com o conteúdo luminal, extraídos. Os intestinos dos insetos foram macerados em salina e submetidos à centrifugação por 10 min a $12.000 \times g$ a 25° C, e o sobrenadante contendo a α -amilase foi reservado para as análises posteriores. A α -amilase salivar humana foi obtida comercialmente (Sigma - Aldrich).

Os ensaios inibitórios de α-amilase utilizando *C. maculatus* e α-amilases salivares humanas foram realizados utilizando o método descrito por Nascimento (DO NASCIMENTO *et al.*, 2011). As enzimas (25 μg / mL em tampão de fosfato 0,01 M, pH 5,5) foram analisadas usando um substrato de amido a 1%. A reação foi interrompida pela adição de ácido dinitrosalicílico 3,5 a 100 ° C e monitorizada a 540nm. Cada ensaio continha 10 U de α-amilase. A α-amilase foi incubada com 10 μg de nRic c 1, rRic c 1 ou mrRic c 1 num banho de água a 37 ° C durante 15 minutos, posteriormente foi incubado a solução do substrato (1% de amido) por 30 min. Todos os ensaios de inibição foram realizados em triplicata.

3.7.2. Avaliação de Perfil Alergênico das Proteínas Recombinantes (rRic c 1 e mrRic c1)

Para avaliar se mrRic c 1 modula o início da resposta alérgica, foi realizado o ensaio de degranulação dos mastócitos de rato e a análise dos perfis de anticorpos produzidos após a imunização em camundongos, IgG total, IgG1 e IgE foram analisados. Para confirmar se mrRic c 1 tem a capacidade de reconhecer IgEs de pacientes atópicos foram realizados ensaios de ELISA em 20 pacientes austríacos.

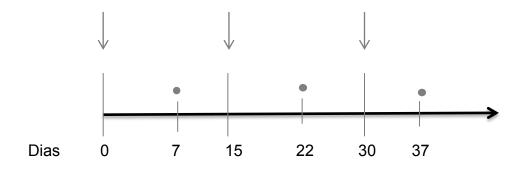
3.7.2.1. Ensaio de Degranulação de Mastócitos de Rato

Os mastócitos de ratos foram isolados como descrito por Deus-de-Oliveira *et al.*, (2011). Os ratos *Wistar* pesando aproximadamente 250 g foram submetidos à eutanásia com CO2, e uma lavagem peritoneal foi realizada por meio da injeção de 20 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contém 12 U/mL de heparina. O abdômen foi massageado suavemente por aproximadamente 90s. A cavidade peritoneal foi cuidadosamente aberta e o fluido contendo células peritoneais foi aspirado com uma pipeta Pasteur. As células foram transferidas para placas de Petri e incubadas a 37 ° C durante 30 min. Dois terços do sobrenadante foram aspirados e descartados. Os mastócitos foram separados em alíquotas de 100 µL (aproximadamente 1,0 × 104 células) e mantidos à temperatura ambiente. Os mastócitos peritoneais de rato (100 µL) foram incubados com soro pré-imune de rato como um controle negativo e com o soro de um rato previamente imunizado com albumina 2S. Os soros de ratos R / A Tor, altos produtores de IgE, foram utilizados nestas experiências como fonte policlonal de IgE (IgE anti-albumina 2s). As células foram sensibilizadas com IgE de rato anti-albumina 2s, lavadas duas vezes com

DMEM e depois incubadas com a amostra. Cada experiência foi realizada na presença ou ausência de 100 ng de nRic c 1, rRic c 1 ou mrRic c 1. A extensão da desgranulação de células mastócicas foi determinada após a incubação com IgE de rato (soro de rato R / A Tor) e posterior exposição a nRic c1, rRic c1 ou mrRic c1. Resumidamente, as células (10 μL) foram coradas durante 15 min com 10 μL de 0,1% de azul de toluidina contendo 10% de formaldeído e 1% de ácido acético, pH 2,8, para visualizar os mastócitos degranulados. Os mastóculos granulados e desgranulados foram contados sob um microscópio óptico em 40X em uma câmara de Neubauer. O ensaio foi repedido 3 vezes, para validação de seus resultados.

3.7.2.2. Análise do Perfil de Anticorpos Durante a Imunização em Camundongos Balb/c

Os camundongos Balb/c foram divididos em três grupos (2 camundongos por grupo): o primeiro grupo (G1- PBS) sensibilizado com solução salina tampão de fosfato (PBS do inglês *phosphate buffered saline*), o segundo grupo, sensibilizado com Ric c 1 natural extraído da semente (G2- nRic c 1) e terceiro grupo sensibilizado com recombinante mutante (G3 -mrRic c 1). Os ratos foram sensibilizados com 0,1 µg de hidróxido de alumínio como adjuvante + 2mg nRic c 1 ou mrRic c 1 em uma solução de 100 µL de PBS no dia 0, dia 15 e dia 30. As aplicações ocorreram na região abdominal subcutânea. A coleta de sangue dos animais por via ocular foi sete dias após cada imunização. O sangue foi centrifugado e coletado o soro. Os animais foram imunizados e fotografados para acompanhamento da resposta imunológica cutânea.



Esquema 1 - Protocolo de Imunização Fonte: própria autoria

As setas representam os dias de coleta de sangue e os pontos os dias de imunização

As imunoglobulinas: IgG total, IgG1 e IgE foram investigadas usando um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA , do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*). Para isso, a placa de 96 poços (Nunc Immuno) foi sensibilizada com 0,33 µg de albumina 2s de *R communis* e incubada durante 18 h. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS, pH 7,0. A solução de bloqueio composta de 1% de gelatina diluida em água destilada e PBS contendo 200µL de *Tween* 20 foi incubada por 1h; posteriormente foi realizado a incubação com anticorpo primário (Soro dos camundongos imunizados) nas proporções de 1: 500 durante 1 h a 37 ° C, seguidas de passos de lavagem. Finalmente, incubação com o anticorpo secundário nas proporções (IgE 1: 200, IgG 1: 500, IgG1 1: 100) durante 1 h a 37 ° C. A detecção foi realizada utilizando o kit comercial de peroxidase. A densidade ótica foi realizada em leitor de microplacas 490nm.

3.7.3. Seleção de Pacientes Alérgicos a Diferentes Fontes Alergênicas pela Plataforma MeDALL

O chipes de *microarrays* utilizadas na plataforma MeDALL foram previamente construídos (LUPINEK *et al.*, 2014). Para tanto cada proteína / alérgeno, 50-200 fg, correspondente a 1-5 attomol, foi aplicado em triplicata no chip. O chipe MeDALL-array foi feita pela empresa *Phadia Austria GmbH* (Viena, Áustria). Os alérgenos readicionados ao chipe são descritos (LUPINEK *et al.*, 2014). Para análise dos soros os chipes foram lavados em tampão de lavagem (Phadia AB) por 1 min em agitação. Após a secagem dos chipes por centrifugação a 1000 g durante 1 min, aplicou-se alíquotas de 35 µL por amostra de soro que foram previamente centrifugados durante um minuto e incubadas durante 2 h. Para a detecção de IgE, os soros foram aplicados não diluídos, seguido de lavagem como descrito acima, seguido por secagem por centrifugação. Os chipes foram digitalizados usando um scanner laser confocal (Microarrays Scanner LuxScan-10 K, Capital-Bio, Pequim, República Popular da China) e avaliado pelo *Micro-array Image Analyzer Software* v3.1.2 (Phadia AB).

3.7.4. Seleção de Soro de Pacientes IgE- reativos a Ric c 1

Foram analisados por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) soros de 20 pacientes atópicos austríacos pré-selecionados pela plataforma MeDALL

(LUPINEK et al., 2014) na Universidade Médica de Viena. Para tanto placas de 96 poços (Nunc Immuno) foram sensibilizadas com 100 µL de uma solução contendo 0,33 µg de 2S alb de R. communis; Para controle positivo foi utilizado 0.33µg de CamF1 (principal alérgeno de ácaro), e soro de paciente reativo a CmF1. Como controle negativo foi usado soro de pacientes não alérgicos. As amostras de Ric c 1 e CamF 1 foram solubilizadas em tampão bicarbonato pH 9.6 e incubada durante 18 h a 4°C. Em seguida, foram realizadas cinco lavagens com PBS, pH 7,0. A solução de bloqueio composta de 1% de BSA e PBS Tween 20% em 200µL foi incubada por 2,5h a 37°C. O soro dos pacientes foram diluídos na proporção de 1:5 em PBS Tween 20% durante 18 h a 4°C, seguidas de passos de lavagem como descrito. Finalizando, a incubação com o anticorpo secundário anti-IgE humano nas proporções 1: 2500 ocorreu durante 1 h a 37 ° C e 1h a 4°C. A revelação foi realizada com ABTS substrato [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] (Sigma-Aldrich) contendo: uma solução de 129.2mg de ácido cítrico, 137g de Na2HPO4, 1µL de H2O2, 10mg ABTS em 10mL de água destilada. Após a aplicação de 200µL da solução em cada poço, a reação colorimétrica ocorreu em 10 minutos. A densidade ótica foi realizada em Leitor de microplacas 490nm. Os soros dos paciente que apresentaram maior titulação de IgE reativa com Ric c 1 foram submetidos a um novo ELISA, para testar a reatividade com o alérgeno mutante produzido (mrRic c 1). Para tanto a placa de 96 poços incubadas com os alérgenos de nRic c 1 e da proteína mutante mrRic c 1. Segui o protocolo descrito anteriormente.

3.7.5. ELISA- Competição de IgE com Soro dos Pacientes IgE-reativos a Ric c 1

Visto que a amostra utilizada nos ensaios de ELISA tratava-se da amostra de nRic c 1 estraída da semnete, nós idealizamos um ensaio de ELISA-competição, para avaliar se as respostas dos pacientes previamentes identificados à nRic c 1, não se tratava de uma interação entre a lectina contida no soro e a algum carboidrato contido no extrato da semente. Para tanto o soro dos dois pacientes previamentes identificados como reativos a Ric c 1 (P6 e P9) na proporção de 1:5 foram previamenete incubados com 1µg/mL de HRP, Bromelaina (carboidratos) e Ric c 1 (proteína alergénica), os soros incubado com os inibidores foram mantidos

por 18h a 4°C, todas as outras etapas do ELISA seguiram como descrito no ítem anterior.

3.7.6. Investigação de Reatividade a mrRic c 1 com Soro de Pacientes IgE-Reativos a Ric c 1

Foi realizado ELISA com o soro dos dois pacientes previamente selecionados como IgE- reativos a Ric c 1. Para tanto a placa de 96 poços foi sensibilizada com 0,33µ da variante mutande (mrRic c 1). Todas as etapas do ELISA seguiram como descritas no ítem anterior.

4. RESULTADOS

4.1. Indução da Expressão de rRic c 1

A indução da expressão de rRic c 1 foi realizada, e a partir desta análise, foi possível comparar os tempos de indução e a concentração de IPTG ideais (Fig. 14). Observa-se que 1mM de IPTG em 3h e 16h de indução foi a melhor condição em ambos os clones A e B; a e b (visto intensidade das bandas). Para os seguintes experimentos foram utilizados 1mM de IPTG e o tempo em >3h <16h de indução.

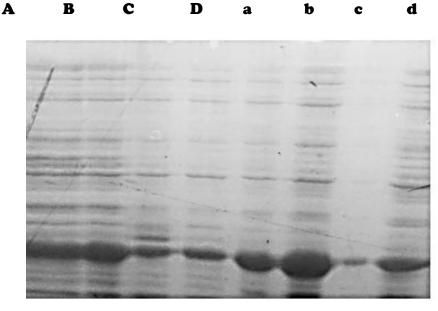


Figura 14 - Imagem do SDS-PAGE demonstrando o aperfeiçoamento da padronização da expressão de rRic c 1

Em letra maiúscula estão representados as amostras referentes ao clone 1 e Letra minúscula amostras referentes ao clone 2. Sendo A,a e B,b com 16h de indução, 0,5mM e 1,0mM de IPTG respectivamente, C,c e D,d com 3h de indução e 1mM e 0,5.

Fonte - Dados da Pesquisa

As células de Rosetta gami2 (DE₃) pLysS que abrigam a construção plasmidial pET-Ric c 1 e as células controle sem vetor foram cultivadas como descrito acima. Produzimos uma versão de Ric c 1 contendo o peptídeo de ligação que une as duas cadeias e associado a uma sequencia de seis histidinas consecutivas e a tioredoxina (rRic c 1). O SDS-PAGE para ambas as proteínas, indicaram que as células transformadas produziram uma proteína principal de 29 kDa (Fig. 15A, coluna b). Esta banda distinta não foi observada na posição correspondente no controle (Fig. 15A, coluna a). A produção de rRic c 1 como proteína induzida de 29 kDa, após purificação por cromatografia de fase reversa, foi confirmada por *western blot* (Fig. 15B) Este experimento também demonstrou sua correta tradução no citoplasma da cepa de expressão.

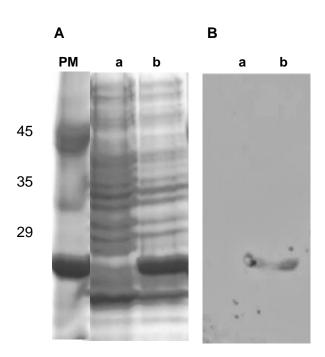


Figura 15 - A- Visualização eletroforética da indução da expressão da proteína recombinante rRic c 1 com 1 mM de IPTG. B- western blot com anticorpo ant-alb 2s de camundongo

PM representa o padrão de peso molecular Em **a** estão representadas as culturas não induzidas e em **b** amostras induzidas é possível visualizar uma banda de aproximadamente 29 kDa que não está presente nas amostras não induzidas.

Fonte - Dados da Pesquisa

4.2. Purificação de rRic1 por Cromatografia de Fase- reversa

A princípio, a técnica utilizada para a purificação da proteína recombinante foi por cromatografia de afinidade ao íon metálico Níquel, em coluna de Ni-NTA. Porém apesar da técnica ser uma das mais aplicadas em trabalhos da área (Crowe et al., 1994; Brown et al., 2014), nos nossos experimento esta metodologia de purificação apresentou um baixo rendimento de recuperação da proteína. Buscando métodos alternativos, empregamos também a cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema HPLC. Para a purificação da rRic c 1 foi usada cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema HPLC. Para tanto foi necessário verificar o perfil cromatográfico da Ric c 1, observando principalmente o tempo de retenção, em seguida aplicada a amostra referente à rRic c 1, ainda contendo a cauda de histidina e a tioredoxina. Esta por sua vez apresentou um tempo de retenção tardio quando comparado à Ric c 1; um perfil esperado já que a presença das caudas de tioredoxina e histidina inseridas à rRic c 1 pelo vetor pET 32 EK / LIC que altera significativamente a hidrofobicidade. Após a clivagem enzimática foi possível visualizar os pico com o mesmo tempo tanto para rRic c 1 como para Ric c 1 obtidas de forma natural.

A proteína recombinante rRic c 1 marcado com 6xHis foi eluído aos 33 min (Fig. 16, pico vermelho). Esta proteína foi clivada por (enteroquinase) EK e purificada por HPLC coluna C2/C18 de fase reversa. Um pico que foi eluído aos 26 min, rRic c 1 obteve sobreposição com nRic c 1 (Fig. 16, linha rosa), este foi isolado e caracterizado. As fracções recolhidas foram visualizadas por SDS-PAGE, podendo ser visualizado o extrato induzido (I), o extrato induzido e purificado (Ia), o extrato clivado (II) e o padrão de albumina 2s Ric 1 e Ric c 3 (III) (inserção da Fig. 16) . A sequência N-terminal da fração recolhida aos 26 min confirmou que a sequencia que codifica Ric c 1 tinha sido expressa e que rRic c1 foi produzida. (inserção da Fig. 16).

Assim, esta técnica, com bom rendimento e fácil caracterização, passou a ser utilizada para os experimentos posteriores. Adicionalmente a quantificação de rRic c 1 pôde ser realizada a cada corrida cromatográfica, utilizando Ric c 1 como um padrão externo a 280nm, sem a necessidade de utilizar técnicas de quantificação de proteínas destrutivas, como BCA ou Bradfo

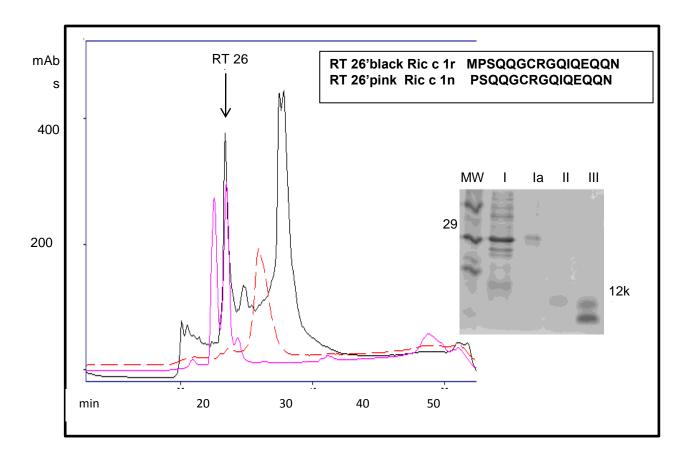


Figura 16 - Sobreposição dos cromatogramas de fase reversa em colunas C2/C18 em sistema HPLC

As amostras de albumina 2S (contendo Ric c1 e Ric c 3, linha rosa), rRic c 1 ainda ligada às caudas de histidina e tioredoxina (linha vermelha) e rRic c 1 após clivagem com a enterokinase (linha preta). Note a sobreposição dos picos rosa (nRci c 1) e preto (rRic c 1 após clivagem). A seta destaca o pico referente a rRic c 1. Sequencia N terminas de rRic c 1 e nRic c 1, note que rRic c 1 apresenta no inicio de sua sequencia um resíduo de metionina (M) adicionado como um requerimento para se clonar no vetor pET-32 EK/LIC. SDS-PAGE com a representação das etapas de purificação SDS-PAGE com a representação das etapas de purificação. (I) extrato induzido, (Ia) extrato induzido e purificado, (II) extrato clivado, (III) padrão de albumina 2S contendo Ric 1 e Ric c 3.

Fonte - Dados da Pesquisa

4.3. Expressão de Ric c 1 mutante (mrRic c 1)

A Sintese da sequência codificante de mrRic c 1 contendo mutações foi realizada comercialmente. A sequência do gene, determinada pela Invitrogen, confirmou a troca dos códons codificantes de resíduos de ácido glutâmico para resíduos de leucina nas posições destacadas com as setas (Fig. 17).

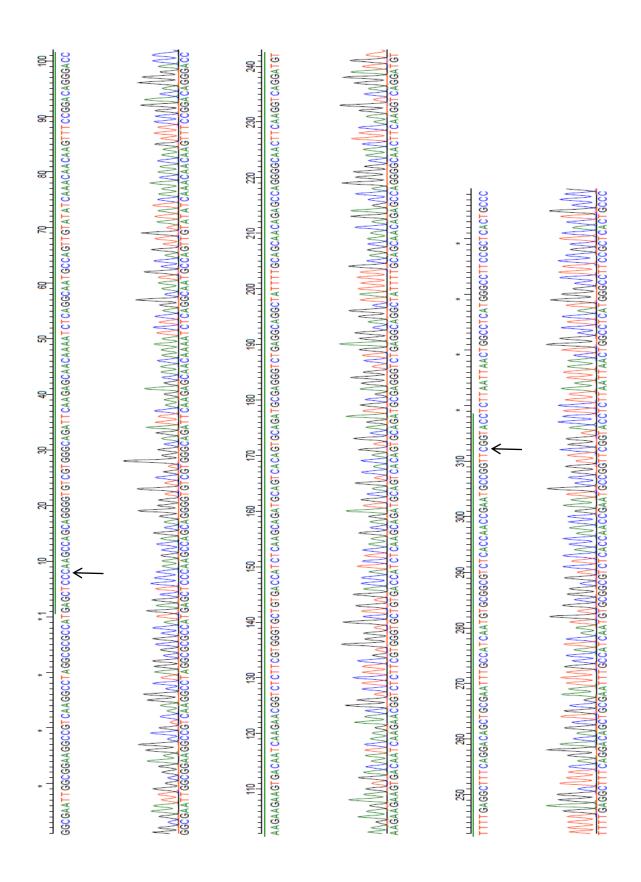


Figura 17. Sequência de nucleotídeos de mrRic c 1, produzida por Invitrogene
Estão destacados os códons mutantes.
Fonte - Dados da Pesquisa

A expressão de mrRic c 1 ocorreu nas células de E. coli Rosetta-gami transformadas com o vetor de expressão pET-32 EK / LIC, como demonstrado na figura (18). O SDS-PAGE indicou que as células induzidas E. coli Rosetta-gami2 (DE3) pLysS produziram uma banda de proteína de 29 kDa não identificada nas células que não foram induzidas com a presença de IPTG (Fig. 18 - b, linha I).

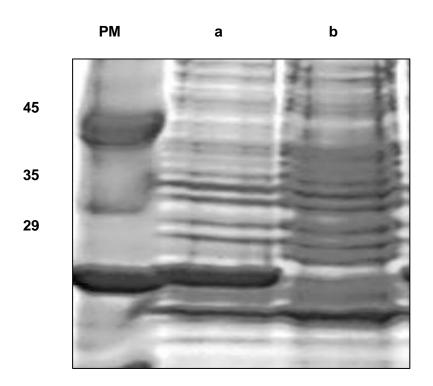


Figura 18: Visualização eletroforética da Indução da expressão de mrRic c 1 por SDS-PAGE.

PM - é o padrão de massa molecular, **a-** representa o extrato induzido de mrRic c 1, **b-** representa o extrato controle não induzido.

Fonte - Dados da Pesquisa

4.4. Purificação de Ric c 1 Mutante (mrRic c 1) por Cromatografia de Fase- reversa e Caracterização da Fração Purificada

O perfil cromatográfico da purificação da mrRic c 1 é apresentado na Figura 19 onde são observados sobrepostos com Ric c 1 (grupo de albumina 2S) e mrRic c 1 sob as mesmas condições de eluição. A linha vermelha mostra o fracionamento da albumina 2S em dois picos principais, que foram eluídos com tempo de retenção de 32 min e correspondendo à nRic c 3 e 36 min correspondendo a nRic c 1. O perfil cromatográfico do extrato induzido bruto, apresentado na linha azul, indicou um pico largo eluído entre 47 e 50 min. O pico Azul foi concentrado tratado com a enzima

EKe recromatografado. O perfil obtido após fracionamento do hidrolisado enzimático, nas mesmas condições, estava presente na linha preta. Note que este pico se sobrepõe ao tempo de retenção da nRic c1 (Fig. 19).

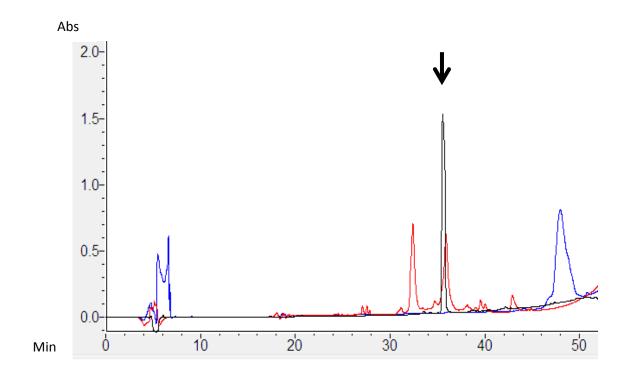


Figura 19: Sobreposição dos cromatogramas de fase reversa em colunas C2/C18 em sistema HPLC.

As amostras de albumina 2S (contendo Ric c1 e Ric c 3, linha vermelha), mrRic c 1 ainda ligada às caudas de histidina e tioredoxina (linha azul) e mrRic c 1 após clivagem com a enterokinase (linha preta). Note a sobreposição dos picos vermelho (nRci c 1) e preto (mrRic c 1 após clivagem).

Fonte - Dados da Pesquisa

As análises por eletroforese (Fig. 20 - A) do extrato total da indução onde é observada uma banda forte de aproximadamente 29 kDa e do pico equivalente a mrRic c 1 (referente à amostra da linha azul) são mostradas nas linhas a e b, respectivamente. O Western Blot (Fig. 20 - B) confirmou que as duas bandas de aproximadamente 29 kDa são a mrRic c 1, pois ambas foram reconhecidas pelo anticorpo contra albumina 2S. O Western blot também indicou que mrRic c 1 foi corretamente traduzida dentro do citoplasma da cepa de expressão.

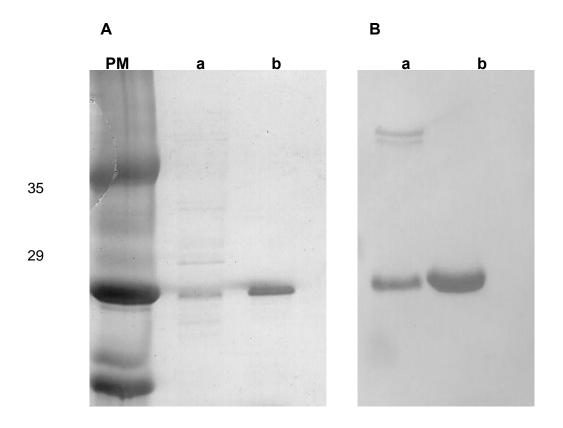


Figura 20: (A) Visualização eletroforética da mrRic c 1 após cromatografia em fase reversa em coluna C2/C18 em sistema HPLC

PM representa o padrão de massa molecular; a - representa o extrato total de indução, b a purificação de mrRic c 1 pós cromatografia de fase reversa. (B) *Western Blot* das amostras mostradas em (A) mostrando a marcação das proteínas de 29 kDa com anticorpo antialbumina 2S de *R. communis*.

Fonte - Dados da Pesquisa

O pico eluído aos 36 minutos foi recolhido e a sua estrutura primária foi determinada por espectrometria de massa. A Tabela 3 apresenta massa moleculares e sequências dos peptídeos trípticos identificados por espectrometria de massa e a sobreposição destes peptídeos com a sequência de mrRic c 1 prevista. A cobertura da estrutura primária de mrRic c 1 foi quase completa por espectrometria de massa e apenas o peptido N-terminal (MPSQQGCR) foi identificado pela degradação de Edman

Tabela 3 - Peptídeos Identificados por Espectroscopia de Massa

Destacando, em vermelho, os resíduos de leucina que eram pontos de mutação.

Número do peptídeo	Massa Molecular	Sequência Obtida
P1	2147.1026	GQIQ L QQNLRQCQ E YIK
P2	1889.9651	QCQLYIKQQVSGQGPR
P3	1112.5919	QQVSGQGPRR
P4	748.3220	SDNQER
P5	1245.5828	SLRGCCDHLK
P6	1807.7456	GCCDHLKQMQSQCR
P7	3134.5436	C E GLRQAI L QQQSQGQLQGQDVFEAFR
P8	1997.8878	TAANLPSMCGVSPTECRF

Sobreposição de peptídeos trípticos, identificados por espectroscopia de massa, na sequência mrRic c1 prevista

PSQQGCR/GQIQ**E**QQNLRQCQ**E**YIK/QQVSGQGPRR/SDNQER/SLRGCCDHLK/QMQ SQCR/C**E**GLRQAI**L**QQQSQGQLQGQDVFEAFR/TAANLPSMCGVSPTECRF

Fonte - Dados da Pesquisa

4.5. Atividade Biológica Estrutura-dependentelnibição da α-amilases

Para confirmarmos que as estruturas das proteínas recombinante não sofreu alteração capaz de alterar a atividade biológica descrita por Nascimento (2011), foi realizado o ensaio de inibição de α-amilase com nRic c 1, rRic c 1 e mrRic c 1 e foi observado que todas as formas, a natural, recombinante e recombinante mutante, e na mesma concentração inibiram 100% da atividade da α-amilase do *C. maculatus* (Fig. 21). Estes resultados indicaram que mrRic c 1 e rRic c 1 sintetizados em células procarióticas mantiveram a atividade biológica semelhantes ao nRic c 1 isolado a partir de sementes de *R. communis* e que as mutações nos resíduos de ácido glutâmico não afetaram a atividade inibitória sobre α-amilases, como planejado.

^{**}O peptídeo correspondente á sequencia amino terminal "PSQQGCR" não foi identificado; O destaque cinza indica que o peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada, normalmente liberado por modificação pós traducional na planta foi mantido na proteína recombinante mutante

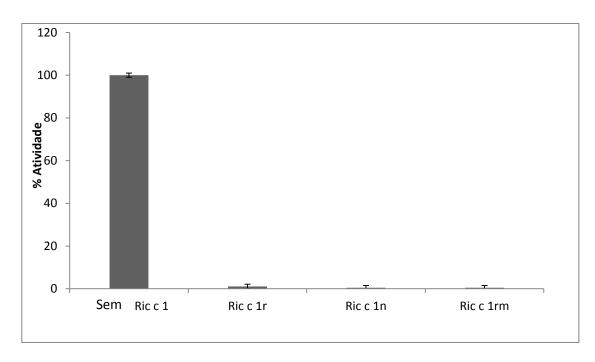


Figura 21: Visualização gráfica da inibição de enzimas α-amilases do intestino do inseto *Callosobruchus maculatus* pelas nRic c 1, rRic c 1 e mrRic c 1
Todas as três formas da Ric c 1 inibiram a atividade enzimática. Este resultado indica que as mutações feita em mrRic c 1 não afetaram a atividade biológica de inibir α-amilases.

Fonte – Dados da Pesquisa

4.6- Desgranulação de mastócitos e perfil de anticorpos produzidos durante a imunização em camundongos

Para verificarmos se a Ric c 1rm perdeu sua capacidade de associar a IgE foram feitos testes de desgranulação de mastócito. Inicialmente foi comparado o potencial de degranulação de mastócitos, tanto de nRic c 1 nativa quanto de Ric c 1r recombinante sem mutações. Como controle do isolamento de mastócitos foi feito um ensaio de desgranulação na ausência do alérgeno (Fig. 22). A partir deste ensaio foi possível observar que rRic c 1 induziu degradação de 67%, o extrato contendo Ric c 1 e Ric c 3 (*pool* de albuminas 2S de mamona) induziu 76% e o nRic c 1 induziu 75,8% (Fig. 22), demonstrando que as características alergênicas de rRic c1 eram semelhantes as da proteína nativa. Estes resultados indicaram que a atividade biológica de rRic c1 sintetizada em células procarióticas como uma única cadeia era semelhante à de nRic c1 isolada a partir de sementes de *R. communis* e que, portanto, era composta de duas cadeias polipeptidicas. Enquanto isso, mrRic c 1 não induziu a degranulação dos mastócitos, uma vez que a degranulação dos mastócitos observada foi de 25%, semelhante ao controle negativo. Tomando este ensaio e o de inibição de α-amilases, estes resultados indicam que o processo de

troca dos resíduos de ácido glutâmico nos epítopos alergênicos não alterou a capacidade de mrRic c 1 de inibir α-amilases e ao mesmo tempo eliminou a capacidade de mrRic c 1 de desgranular mastócitos sensibilizados

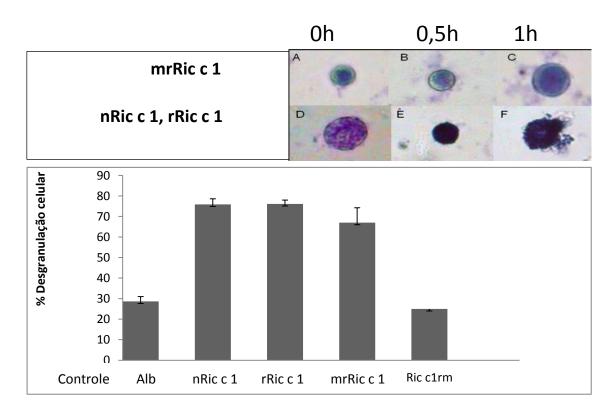


Figura 22: Ensaio de Desgranulação de Mastócitos

Control: controle negativo (mastócitos sem alérgenos; Alb : Ric c 1 e Ric c 3; Ric c 1n: Ric c 1 natural; rRic c 1; mr Ric c 1.

Fonte – Dados da Pesquisa

4.7 Avaliação do Perfil de Anticorpos Produzidos no Processo de Imunização em Camundongos BALB/C

A partir do ELISA para avaliar o perfil de produção de anticorpos IgE, IgG total e IgG1 (Fig. 23), foi possível observar que: os camundongos que foram imunizados com 10 μg de albumina 2S de *R. communis*, apresentam na segunda imunização uma produção maior de IgE, quando comparado com os camundongos que foram imunizados com mrRic c 1, o que nos indica sutilmente, já que o modelo de BALB/C não apresenta altas titulações de IgE alérgeno específica. No entanto, o perfil de IgG 1 demonstrou que os animais imunizados com albuminas 2S apresentaram um pico nos títulos de IgG1 na 3 imunização, quando comparado com as imunizações realizadas com mrRic c 1. Como IgG1 é um anticorpo produzido em reações de

Hipersensibilidade do tipo I (reações alérgicas), foi possível observar que os camundongos imunizados com mrRic c 1, não apresentaram a produção deste anticorpo. Desta forma, podemos entender que os camundongos imunizados com o alérgeno natural (albuminas 2S) apresentaram altas taxas de IgG1, e IgG total, caracterizando um perfil alergênico. Já os animais imunizados com Ric c 1rm, não apresentaram produção de IgG1, ou seja, o perfil alergênico provavelmente não foi desenvolvido, porém apresentaram títulos de IgG total, o que demonstra que o perfil pro-inflamatório Th1 está sendo desenvolvido.

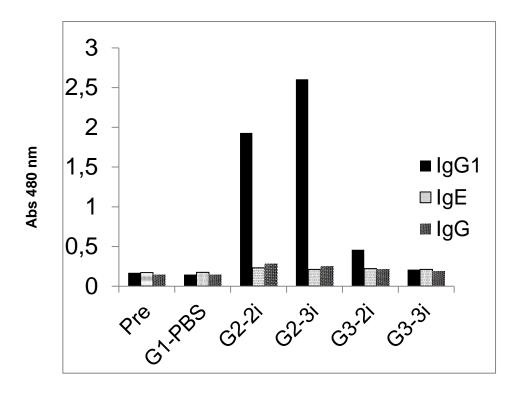


Figura 23 - Perfil de Anticorpos Produzido após Imunização. Pre: soro coletado pré imunização

G1-PBS: Grupo controle imunizado com PBS; G2-2i: Grupo imunizado duas vezes com Ric c 1 natural; G2-3i: Grupo imunizado três vezes com Ric c 1 natural; G3-2i: Grupo imunizado duas vezes com mrRic c 1; G3-3i: Grupo imunizado três vezes com mrRic c 1.

Fonte - Dados da Pesquisa

4.8 Manifestação Cutânea nos animais imunizados com o alérgeno natural

Foi observado Inflamação cutânea nos animais que receberam as imunizações com o alérgeno natural (nRic c 1). Este perfil não foi observado nos animais imunizados com Ric c 1rm, sendo possível demonstrar que a resposta alérgica local, não foi desenvolvido quando as imunizações seguiram com o

hipoalérgeno mutante. Este resultado somado ao perfil de produção de anticorpos indica que mrRic c 1 é uma variante hipoalergênica de Ric c 1.



Figura24 - Manifestação cutânea nos indivíduos imunizados com Ric c 1+ Ric c 3
Fonte - Dados da Pesquisa

4.9 Seleção de Pacientes Alérgicos a Diferentes Fontes Alergênicas pela Plataforma MeDALL

Os pacientes foram selecionados pela plataforma MeDALL (do inglês *Mechanisms for the development of allergies*). E identificados quanto ao tipo de resposta alérgenos específicas eles possuíram. Foram identificados pacientes alérgicos a Bet v1, alérgeno característico de bétula; Der p2, alérgeno característico do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*; Ara 8 e Ara 6, alérgeno característico de amendoim; Glm 4, alérgeno característico de soja. Todos os 20 pacientes detectados foram utilizados posteriormente para analisar resposta cruzada com Ric c 1 (Tabela 4).

Tabela 4 - Detecção da reatividade de IgE com Ric c 1 e mrRic c 1 em soro de pacientes atópicos.

ID paciente	Alérgeno	Fonte do Alérgeno
P1	Bet v1	Bétula
P2	Bet v1	Bétula
P3	Bet v1; Der p2	Bétula; Ácaro
P4	Bet v1; Der p2	Bétula; Ácaro
P5	Bet v1	Bétula
P6	Ara8 e6; Glm8 e 4	Amendoim; Soja
P7	Bet v1; Der p2; Glm4	Bétula; Ácaro; Soja
P8	Bet v1	Bétula
P9	Bet v1;Glm4; Ara8	Bétula; Soja; Amendoim
P10	Bet v1; Der p2	Bétula; Ácaro
P11	Bet v1; Der p2	Bétula; Ácaro
P12	Bet v1, Ara 8 e 6	Bétula; Amendoim
P13	Bet V1	Bétula
P14	Der p2, Glm4	Bétula; Soja
P15	Bet v1; Der p2, Glm4	Bétula; Ácaro; Soja
P16	Bet v1;Ara 8;Glm4	Bétula; Soja; Amendoim
P17	Der p2, Ara 8	Ácaro; Amendoim
P18	Bet v1; Der p2	Bétula; Ácaro
P19	Bet v1; Der p2	Bétula; Ácaro
P20	Bet v1; Der p2	Bétula; Ácaro

Fonte – Dados da Pesquisa

4.10 Reatividade cruzada dos pacientes alérgicos a diferentes fontes de alérgenos com Ric c 1

O soro dos 20 pacientes detectados anteriormente foram submetidos as teste de ELISA para detectar reatividade cruzada com Ric c 1. Foi verificado que os pacientes IgE- reativos a Ara 8 e Glm4 concomitantemente apresentaram maiores respostas de reatividade de IgE com Ric c 1, estes encontram destacados no gráfico.

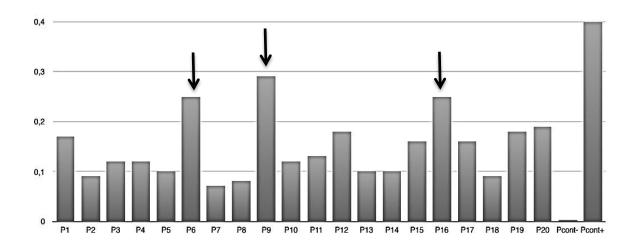


Figura 25 - Análise das respostas cruzadas de 20 pacientes alérgicos (P1 a P20) a Ric c 1
Fonte - Dados da Pesquisa

4.11 ELISA- inibição de IgE com Soro dos Pacientes IgE-reativos a Ric c 1

O esnsaio de inibição dos soros dos pacientes reativos a Ric c 1 foi realizado com a finalidade de confirmar que a reatividade dos pacientes era de fato a amostra de Ric c 1 e não a outros carboidratos que possam conter na amostra (por ser uma proteína extraída diretamente semente ou por contaminação de meios do meio de dissolução). Para tanto foram analisadas as reatividades dos soros dos pacientes P6 e P9 com os carboidratos HRP, Bromelaína e com a proteína alergêncica Ric c 1. Foi possível confirmar que Ric c 1 apresentou maior capacidade de inibição, quando comparado aos demais carboidratas, excluindo a hipótese de reatividade cruzada com outros extratos da semente (Figura 26).

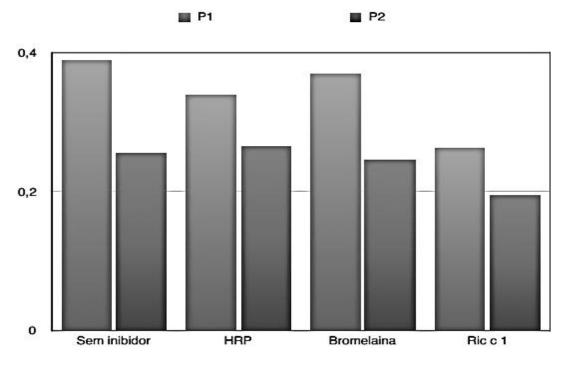


Figura 26 - Inibição do soro dos pacientes reativos a Ric c 1 (P6 e P9), com HRP, bromelaina (carboidratos) e Ric c 1 (alérgeno)

Fonte - Dados da Pesquisa

4.12 Reatividade de pacientes alérgicos a Ric c 1 com mrRic c 1

Para testar a capacidade de reconhecimento da IgE de pacientes reativos a Ric c 1 com a proteína mutante mrRic c 1 foi realizado ELISA. Sendo possível avaliar que os pacientes reativos a Ric c 1 não apresentaram capacidade de interação a mrRic c 1 (Fig. 27), fato este, que comprova que as alterações nos aminoácidos específicos na interação com a IgE impedem a ligação da mesma coma proteína mutada confirmando a sua hipoalergênicidade. Levantamos a hipótese que possivelmente em um processo de imunização com mrRic c 1 não ocorrerá resposta alérgica, uma vez que as IgEs presente na membrana das células granuladas, não terão capacidade de ligar-se de forma cruzada aos epitopos, uma vez que houve a alteração do ácido glutâmico, o principal aminoácido envolvido neste processo, desta forma a proteína mutante e não irá ter a capacidade de disparar a sinalização celular para que haja a desgranulação, liberação dos mediadores inflamatórios.

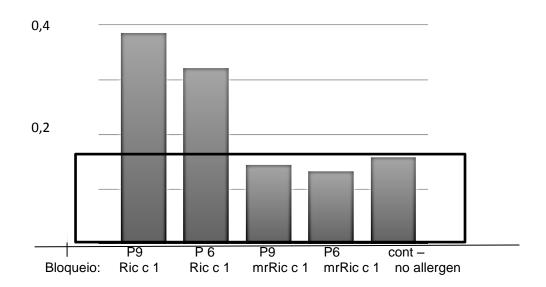


Figura 27 - Perfil das respostas dos pacientes IgE reativos a Ric c 1 (P6 e P9) quando expostos a mrRic c 1
Fonte – Dados da Pesquisa

5 - DISCUSSÃO

Sabe-se que a alergia é um problema crescente e mundial, estima-se que 30% da população mundial sofram com algum tipo de alergia. As alergias respiratórias, no entanto, desenvolvidas por aeroalérgenos, principalmente os de fonte vegetal, que se dispersam no ar e possuem uma sazonalidade de acordo com os períodos de floração da espécie cujo pólen contém o alérgeno. Estudos que visam entender os mecanismos alérgicos e que buscam estratégias para profilaxia de doenças alérgicas são de grande importância, pois, reduziriam os casos de alergia e consequentemente os gastos da saúde pública com medicamentos que tratam os sintomas (FERREIRA et al., 2006; VALENTA et al., 2011; VALENTA; NIEDERBERGER, 2007). Para coadjuvar com este cenário, aqui problematizado, foi desenvolvido o presente estudo. Este trabalho teve como principal meta o desenvolvimento de um hipoalérgeno mutante R. communis em resíduos estratégicos de aminoácidos, e propõe a imunoterapia alérgeno específica para o citado alérgeno e possivelmente para alérgenos que possuem reatividade cruzada. O hipoalérgeno foi produzido a partir da tecnologia do DNA recombinante possuindo alteração genética, com mutações em dois aminoácidos envolvidos reconhecimento da IgE presente na membrana de células granuladas présensibilizadas.

Este trabalho iniciou-se com a expressão da proteína recombinante rRic c 1. A produção das cepas competentes de Rosetta gami2 (DE3) pLysS contendo a construção plasmidial pET+Ric c 1 foi desenvolvida por Pacheco-Soares em sua dissertação de mestrado (PACHECO-SOARES, 2014) e estas estavam disponíveis no laboratório, armazenadas a -70°C. Porém, neste trabalho, nós aperfeiçoamos as estratégias de indução, variando as concentrações de IPTG e o tempo de indução. A purificação da proteína recombinante percorreu utilizando a técnica de cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema HPLC. Para tanto foi necessário verificar o perfil cromatográfico da Ric c 1, observando principalmente o tempo de retenção (DEUS-DE-OLIVEIRA et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2010; FELIX et al., 2008), em seguida aplicada a amostra referente à rRic c1, ainda contendo a cauda de histidina, esta por sua vez apresentou um tempo de retenção tardio quando comparado à Ric c 1; no entanto, este era um perfil esperado já que a presença das caudas de tioredoxina e histidina inseridas à rRic c 1 pelo vetor pET-32 EK/LIC

muda a hidrofobicidade desta. Após a clivagem enzimática foi possível visualizar um pico com tempo de retenção de rRic c 1 igual ao da Ric c 1. Assim, esta técnica, com um rendimento maior, passou a ser utilizada para os experimentos posteriores. Adicionalmente a quantificação da rRic c 1 pôde ser realizada a cada corrida cromatográfica, utilizando Ric c 1 como um padrão externo, sem a necessidade de utilizar técnicas de quantificação de proteínas destrutivas, como BCA ou Bradford. Após obtermos a proteína recombinante purificada, a mesma foi submetida ao *Western Blotting* e ao sequenciamento da região N-terminal pela metodologia de Edman. A certificação de que a proteína expressa era de fato Ric c 1 foi obtida pelo reconhecimento com o anticorpo anti-albumina 2S e por homologia com a proteína Ric c 1 e por determinação da estrutura primária por espectrometria de massas. Assim, a proteína isolada foi empregada nos ensaios biológicos de alergenicidade e inibição de α-amilase.

Um fato importante a ser ressaltado é que naturalmente na planta, tanto Ric c 1 quanto Ric c 3 sofrem processamentos pós-traducionais, onde são liberados os peptídeos de ligação. Este fato, no entanto, não ocorre em um sistema bacteriano, portanto, como no caso dessas albuminas 2S, as proteínas expressas em sistema bacteriano são sintetizadas em uma única cadeia e não mais em duas cadeias (cadeia leve e cadeia pesada) como na planta. Logo seria necessário investigar se o peptídeo de ligação, mantido neste sistema de expressão, não iria influenciar nas atividades biológicas.

Uma vez que as condições de expressão da proteína recombinante foram estabelecidas e as atividades biológicas das proteínas isoladas foram confirmadas, iniciamos o processo de obtenção dos hipoalérgenos modificados. A realização das mutações se iniciou com o desenho da região gênica codificante de modo sintético o qual, por sua vez, foi desenhado trocando resíduos específicos de ácidos glutâmicos por resíduos de leucina. Dois resíduos de ácidos glutâmicos são característicos dos epitopos alergênicos de Ric c 1, pois são esses resíduos que interagem com as IgEs presentes na membrana de células granulares sensibilizados (DO NASCIMENTO *et al.*, 2011). No entanto, foi trocado apenas um resíduo de ácido glutâmico dentro de cada um dos dois epitopos alergênicos de Ric c 1. Era de nosso entendimento que, se trocássemos apenas um resíduo de ácido glutâmico, o outro sozinho não teria a

capacidade de realizar a reação cruzada com a IgE e, portanto, não dispararia o processo alérgico (DEUS-DE-OLIVEIRA et al., 2011).

Uma análise importante a ser observada neste processo de mutação da região gênica codificante de Ric c 1 é preservar os resíduos de ácidos glutâmicos que estão envolvidos no sítio de interação com a α-amilase. Caso estes fossem trocados, possivelmente a proteína perderia sua atividade de defesa, ou seja, a atividade inibitória sobre α- amilase.

A região codificante foi então sintetizada comercialmente e toda etapa de clonagem, transformação, indução e purificação seguiu com já padronizado no modelo rRic c 1, para a versão mrRic c 1 não sofrer qualquer alteração de síntese por mudança em protocolo já estabelecido. A única modificação realizada foi referente à cepa de clonagem, que para mrRic c 1 foi utilizado a cepa XL-10, mais nova, adquirida pelo nosso laboratório, por se tratar de uma cepa ultracompetente. Foi possível comprovar a expressão de mrRic c 1 pela técnica de Western Blotting e a confirmação da mutação dos resíduos foi possível por espectrometria de massa. Como a atividade biológica da inibição de \alpha-amilase \(\) dependente da estrutura, em geral associada ao correto enovelamento da proteína, nós idealizamos um teste de inibição contra atividade da α-amilase salivar humana e do intestino de *C. maulatus* com as proteínas natural, recombinante e mutada para analisar a preservação da atividade de defesa. Para ambos os testes foi possível observar que rRic c 1 e mrRic c 1 mantiveram sua característica inibitória da enzima α-amilase. Nossos resultados se assemelham com outros trabalhos dispostos na literatura, que confirmam que a expressão em sistema bacteriano de inibidores de α-amilase pode preservar a sua função inibitória (DIAS et al., 2005). Resultados similares também foram obtidos por Santos et al. 2010. Neste caso, uma defensina de Vigna unguiculata, expressa no mesmo sistema de expressão heterólogo aplicado no presente estudo manteve a atividade inibitória contra α-amilase dos besouros C. maculatus e Z. subfasciatus (DOS SANTOS et al., 2010).

Diversos estudos corroboraram com nossa estratégia de produção de hipoalérgenos a partir de mutações em aminoácidos pontuais. Valenta e colaboradores (2012) demosntraram que era possível construir, purificar e caracterizar duas proteínas recombinantes hipoalergénicos híbridas, Der p 2 (rder p 2) / 1C e rder p 2 / 1S (CHEN et al., 2012). Em 2013 Valenta e colaboradores

demonstram que mutações em resíduos de ácidos aspárticos nos alérgenos de *Brassica rapa* contribui para uma redução na ligação cruzada com a IgE, presente na membrana dos mastócitos sensibilizados, diminuindo o potencial alergênico desta proteína (GARMATIUK *et al.*, 2013). Em 2015 foi produzido um alérgeno recombinate mutante de peixe Cyp (mcyp) e este foi utilizado para imunoterapia Alergenos Alimentares específica (DOULADIRIS *et al.*, 2015). Já Em 2016 o grupo comprovou por testes imunológicos de contato cutâneo que os pacientes imunizados com himipoalérgeno variante de Bet v1 (alérgenos de Bétula) não foram capazes de desenvolver uma resposta alergênica local. Além disso, imunizações em ratos com o mesmo hipoalérgeno recombinante demonstraram que era possível induzir nos animais um perfil de respostas tolerogênica com produção de citocina pro-inflamatórias (VALENTA *et al.*, 2016).

Iniciamos nossos estudos para avaliar a hipoalergenicidade de mr Ric c 1 com o ensaio de desgranulação de mastócitos. Neste teste foi possível comprovar que o potencial alergênico da proteína recombinante (rRic c 1) se manteve como o da Ric c 1 natural. No entanto, esta capacidade foi reduzida quando as células présensibilizadas foram incubadas com mrRic c 1, o que comprova que a alteração do resíduos de aminoácidos impediu a ligação entre a IgE presente na membrana das células e a proteína mutada.

Foi idealizado protocolo de imunização em camundongo Balb/c com a finalidade de observar o perfil de anticorpos produzidos durante a imunização com Ric c 1 (extrato natural) e mrRic c 1 (proteína recombinante mutante), esta análise comprovou que os animais que foram imunizados com Ric c 1 tiveram uma alta produção de IgG1 tanto na segunda quanto na terceira imunização, sabe-se que a produção de IgG1 está diretamente relacionada com o perfil Th2 alergênico (AKDIS; AKDIS, 2014a; BØGH et al., 2013; FOCKE-TEJKL et al., 2015; SACKESEN et al., 2013b). É importante ressaltar que a resposta alérgica em camundongos Balb/c é acompanhada pelos altos índices de produção de IgG1, uma vez que, nem sempre é possível a identificação de IgE específica nestes animais (FERREIRA et al., 2006). Porém os animais imunizados com a proteína mutante mrRic c 1 não apresentaram titulações significativas de IgG1, demostrando que não houve ativação do perfil Th2 alergênico. Foi possível observar que as titulações de IgG total produzidos durante o processo de imunização tanto com Ric c 1 quanto com mrRic c1 obtiveram titulações

similares. Este fato confirma que o perfil de resposta Th1 está sendo induzido pela proteína recombinante, fato este essencial para o desenvolvimento de uma resposta tolerogênica (AKDIS; AKDIS, 2014a, 2014b; BØGH *et al.*, 2013; HOFMAIER; COMBERIATI; MATRICARDI, 2014; JUTEL *et al.*, 2016; MATSUOKA; SHAMJI; DURHAM, 2013; SANTOS *et al.*, 2015; WAMBRE e*t al.*, 2014).

Estudo utilizando alergénos recombinantes purificados e derivados de alérgenos hipoalergénicos recombinantes, confirmaram que um dos principais mecanismos da ASIT, é a indução da produção de anticorpos IgG de bloqueio (VALENTA *et al.*, 2016). Por outro lado, foi demonstrado que o bloqueio por IgG também pode inibir a apresentação de antígeno células apresentadoras de antigénio para células T e, portanto, suprimir a ativação de células T induzida (WOLLMANN *et al.*, 2015). Também foi descoberto que ASIT pode alterar o equilíbrio de células T auxiliares específicas, de um perfil Th2 para um perfil da imunidade Th1 específica para o alérgeno e que pode induzir a secreção de citocinas imunorreguladoras, tais como a IL -10, e células T reguladoras (AKDIS *et al.*, a 2014; AKDIS *et al.*, b 2014; ÁLVARO *et al.*, 2013; JUTEL *et al.*, 2013; MÖBS *et al.*, 2010 ; VALENTA *et al.*, 2011). Assim, a indução da tolerância alérgeno-específica é o mecanismo imunológico essencial da ASIT(JUTEL *et al.*, 2013).

Os resultados a priore desenvolvidos, nos manteve confiantes na hipoalergenicidade de mrRic c1, e nos impulsionou na busca de novos conhecimentos e o domínio de novas técnicas, o que foram fatores estimulantes para o desenvolvimento de um estágio na Universidade Médica de Viena na Áustria sobre a orientação do professor Dr. Rudolf Valenta, já que este apresenta vasta experiência em Imunoterapia Alérgeno-Específica. O estudo desenvolvido em Viena iniciou-se com a busca de pacientes que apresentassem resposta cruzada com Ric c 1, já que *R. communis* é uma planta de clima tropical, não se desenvolve na Áustria, sendo por tanto improvável de ter pacientes sensibilizados com *R. communis* na Áustria, no entanto os resultados de reatividade cruzada previamente descritos por Deus de Oliveira (DEUS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2011), nos estimulou a buscar pacientes que possuíssem reatividade cruzada com Ric c 1. Para tanto foram analisados os soros de 20 pacientes alérgicos a diferentes fontes como descrito na tabela (4).

O soro desses pacientes foram analisados pela plataforma MeDall, plataforma esta desenvolvida pelo grupo. O MeDALL é um programa de pesquisa europeu no qual a tecnologia de microarranjos para alérgenos é utilizada para monitorar o desenvolvimento de doenças alérgicas na infância, desenhar um mapa geográfico do reconhecimento de alérgenos clinicamente relevantes em diferentes populações e estabelecer perfis que prevê reatividade associada a manifestações da doença (HOFMAIER; COMBERIATI; MATRICARDI, 2014) Hoje, um microarranjo para detecção de alérgeno denominado ImmunoCAP ISAC (Phadia AB, Uppsala, Suécia) está disponível para o diagnóstico de alergia baseado em um chipe contendo 112 moléculas de diferentes alérgenos e pode ser usado para determinar as respostas de IgE e IgG. O Immuno CAP ISAC apresenta como fator limitante amostragem sorológica com níveis baixos de IgE podendo não ser suficientemente sensível. Além disso, alguns importantes alérgenos não estão incluídos no chip Immuno CAP ISAC (WOLLMANN et al., 2015). O chip MeDALL foi projetado para aumentar o número de alérgenos e para melhorar a sensibilidade do teste.

Dos 20 pacientes previamente avaliados, três apresentaram respostas cruzadas com Ric c 1(P6, P9 e P16), é importante ressaltar que os três que apresentaram sensibilidade a Ric c 1 são alérgicos a soja e amendoim concomitantemente (dados fornecidos pela plataforma MeDALL), este resultado está de acordo com os resultados de resposta cruzada desenvolvidos por Deus de Oliveira (DEUS-DE-OLIVEIRA et al., 2011). Foram selecionados os pacientes P6 e P9 por apresentarem níveis de IgE mais elevados. Foi investigado por ensaio de competição de IgE por ELISA, se o reconhecimento da IgE foi de fato a amostra de Ric c 1 ou a algum outro carboidrato que pudesse contaminar a amostra, visto que Ric c 1 veio de um estrato natural purificado. Era sabido pelo grupo que pacientes reativos a extratos vegetais muitas vezes eram reativos a carboidratos (Bromelaina e HRP) Foi observado, no entanto, que não se tratava de uma resposta à possíveis carboidratos, já que, os soros dos pacientes que foram previamente incubados com os carboidratos testados não inibiram sua capacidade de ligação com o alérgeno (Ric c 1). Porém o soro pré-incubado com Ric c 1, teve uma diminuição na interação com o alérgeno presente na placa, certamente porque as IgEs presentes no soro quando pré- incubadas com Ric c 1 tiveram seus sítios de ligação ocupados, impedindo a ligação ao alérgeno que cobria a placa de ELISA. Foi observado em adição, que os pacientes reativos a Ric c 1 (P6 e P9) não tiveram a capacidade de reconhecimento à mrRic c 1, comprovando que as mutações realizadas no genótipo de Ric c 1 corromperam a capacidade de interação com a IgE.

Nossos resultados contribuem para o estudo da eficácia da produção de proteínas recombinantes alteradas geneticamente em aminoácidos pontuais para o desenvolvimento da ASIT. Discutimos que é necessário o aumento amostral de indivíduos alérgicos, assim, como se torna necessário a avaliação da produção de IgG de bloqueio nos indivíduos sensibilizados, e entender todos os mecanismos bioquímicos envolvidos na exposição de um indivíduo à molécula recombinante mutada. Entendendo esta necessidade, nosso grupo de pesquisa investe em novas pesquisas de Mestrado e Doutorado com esta finalidade.

É importante ressaltar que todo estudo de alergia deve se basear na importância do alérgeno para uma determinada população, sendo assim é fundamental a criação de banco de soros de pacientes sensibilizados para que se forneça um painel dos alérgenos predominantes no Brasil. Na Europa foram criadas redes integradoras que visam desde o controle e monitoramento do ar, como a rede europeia de aerobiologia, até a criação de banco de soros de pacientes alérgicos, com a finalidade de detectar as prevalências das respostas alérgicas. (CHAPMAN et al., 2008; LUPINEK et al., 2014). Estes projetos integradores são escassos no cenário de pesquisa brasileiro, porém possui grande relevância para a população, visto que o Brasil, segundo a SBAI gasta aproximadamente R\$ 123,2 milhões no Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamentos de alergia, desta forma projetos que visem o entendimento da sazonalidade dos aeroalérginos e o conhecimento do perfil da população alergênica facilitaria o direcionamento no desenvolvimento de vacinas imunomoduladoras para o tratamento e prevenção da doença alérgica. Entende-se que perante a problemática das doenças alérgicas no Brasil, nosso trabalho contribuiu para elucidar mecanismos de desenvolvimento de ASIT a partir de um hipoalérgeno.

6 CONCLUSÃO

Concluímos com o presente trabalho que:

Foi possível clonar e expressar rRic c 1 e rmRic c1 em forma de cadeia única em um sistema de expressão bacteriano mantendo as atividade biológicas de interesse.

A estratégia alternativa para a purificação Ric c 1r e de mrRic c 1, por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, foi eficiente pois tanto rRic c 1 como mrRic c 1 mantiveram a atividade de inibição de α-amilase. Uma atividade dependente da estrutura tridimensional da proteína Ric c 1;

Ric c1 recombinante mutante pode ser considerada um hipoalérgeno pois impediu a resposta Th2, induziu resposta Th1 e reduziu a desgranulação de mastócitos mediada or IgE.

Ric c 1 recombinante mutante apresenta potencial para a produção de vacinas para tratamento de pacientes alérgicos a mamona e a alérgenos que apresentam repostas cruzadas como soja e amendoim visto que os pacientes alérgicos a estas substâncias não apresentaram respostas ao mrRic c 1. Em sua totalidade, os resultados demonstram que mrRic c 1 é uma proteína hipoalergênica que pode ser usada no desenvolvimento de ASIT.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. at al. Imunologia celular e molecular. Elsevier, 8 ed, 2015.

ALLERGEN. Disponível em: http://www.allergenonline.com/. Acesso: 22.01.2018

ABOISSA. Óleos vegetais. Disponível em http://www.aboissa.com.br/mamona/index.htm. Acesso: 20.01.2018, 2005.

AKDIS, C. *et al.* Mechanisms of immune tolerance to allergens: Role of IL-10 and Tregs. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 11, p. 4678–4680, 2014a.

AKDIS, C. A. *et al.* Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 3, p. 621–631, 2014b.

ÁLVARO, M. et al. Allergen-specific immunotherapy: Update on immunological mechanisms. **Allergologia et Immunopathologia**, 2013.

AZEVEDO, D. M. P., Beltrão, N. E. M. O agronegócio da mamona no Brasil. 2 a edição, Embrapa informação tecnológica, 2007.

BØGH, K. L. *et al.* IgE versus IgG4 epitopes of the peanut allergen Ara h 1 in patients with severe allergy. **Molecular Immunology**, v. 58, n. 2, p. 169–176, 2013.

CAMPANA, R. *et al.* Altered IgE epitope presentation: A model for hypoallergenic activity revealed for Bet v 1 trimer. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 4, p. 431–441, 2011.

CAMPANA, R. *et al.* Frequent occurrence of T cell-mediated late reactions revealed by atopy patch testing with hypoallergenic rBet v 1 fragments. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 2, p. 601–609, 2016.

CARVALHO, A. O. *et al.* Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedlings' tissues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 732–742, 2006.

CHAPMAN, M. D. *et al.* The European Union CREATE Project: A model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 5, 2008.

CHEN, G. Q. *et al.* 2S albumin gene expression in castor plant (Ricinus communis L.). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 9, p. 867–872, 2004.

CHEN, K.-W. *et al.* Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 130, n. 2, p. 435–43.e4, 2012.

CHURCH, M.; CHURCH, D. Pharmacology of Antihistamines. **Indian Journal of Dermatology**, v. 58, n. 3, p. 219=224, 2013.

CORDER, L. M. Conjuntura Mensal da Mamona - Janeiro 2016. n. tabela 2, p. 7,

2016.

CRIADO, P. R. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: **Histamine**, **histamine receptors and antihistamines: new concepts.** v. 85, n. 2, p. 195–210, 2010.

D'AMATO, G. Role of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) in the treatment of bronchial asthma and allergic respiratory diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1–3, p. 302–307, 2006.

DA SILVA, J. G. *et al.* Amino acid sequence of a new 2S albumin from Ricinus communis which is part of a 29-kDa precursor protein. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 336, n. 1, p. 10–18, 1996.

DEUS-DE-OLIVEIRA, N. et al. Deus-de-Oliveira, N., Felix, S. P., Carrielo-Gama, C., Fernandes, K. V., DaMatta, R. A., & Machado, O. L. T. (2011). Identification of critical Amino acids in the IgE epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the application of Glutamic acid as an IgE blocker. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

DO NASCIMENTO, V. V. *et al.* In silico structural characteristics and α -amylase inhibitory properties of Ric c 1 and Ric c 3, allergenic 2S albumins from ricinus communis seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4814–4821, 2011.

DOS SANTOS, I. S. *et al.* Purification of a defensin isolated from Vigna unguiculata seeds, its functional expression in Escherichia coli, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. **Protein Expression and Purification**, v. 71, n. 1, p. 8–15, 2010.

DOULADIRIS, N. *et al.* In vivo allergenic activity of a hypoallergenic mutant of the major fish allergen CYP c 1 evaluated by means of skin testing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 2, p. 493–495, 2015.

FELIX, S. P. *et al.* Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from Ricinus communis, by mast cell degranulation assay. **Peptides**, v. 29, n. 4, p. 497–504, 2008.

FERREIRA, F. *et al.* Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 2, p. 231–242, 1998.

FERREIRA, F. *et al.* Modified Recombinant Allergens for Safer Immunotherapy. **Inflammation & Allergy -Drug Targets**, v. 5, p. 5–14, 2006.

FOCKE-TEJKL, M. *et al.* Dissection of the IgE and T-cell recognition of the major group 5 grass pollen allergen PhI p 5. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 3, p. 836–845.e11, 2014.

FOCKE-TEJKL, M. *et al.* Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 5, 2015.

- GARBANI, M. *et al.* Allergen-loaded strontium-doped hydroxyapatite spheres improve allergen-specific immunotherapy in mice. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 4, p. 570–578, 2017.
- GENOV, N. et al. A novel thermostable inhibitor of trypsin and subtilisin from the seeds of Brassica nigra: Amino acid sequence, inhibitory and spectroscopic properties and thermostability. **Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1341, n. 2, p. 157–164, 1997.
- GERALDINI, M. et al. Alérgenos recombinantes na prática da imunoterapia * Recombinant allergens in immunotherapy practice. p. 92–97, 2008.
- GIERAS, A. *et al.* Molecular determinants of allergen-induced effector cell degranulation. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 119, n. 2, p. 384–390, 2007.
- HAMILTON, R. G at al. IgE antibody-specific activity in human allergic disease. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1–3, p. 273–284, 2010.
- HOFMAIER, S.; COMBERIATI, P.; MATRICARDI, P. M. Immunoglobulin G in IgE-mediated allergy and allergen-specific immunotherapy. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, 2014.
- IRWIN, S. D. *et al.* The Ricinus communis 2S albumin precursor: A single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. **Molecular and General Genetics**, v. 222, n. 2–3, p. 400–408, 1990.
- JUTEL, M. et al. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and novel ways for vaccine development. **Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 62, n. 4, p. 425–33, 2013.
- JUTEL, M. et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoeconomicsJournal of Allergy and Clinical Immunology, 2016.
- JUTEL, M.; AKDIS, C. A. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Allergy**, v. 66, n. 6, p. 725–732, 2011.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, 1970.
- LARCHÉ, M.; WRAITH, D. C. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. **Nature medicine**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S69–S76, 2005.
- LINHART, B.; VALENTA, R. Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4328–4335, 2012.
- LUPINEK, C. *et al.* Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: The MeDALL allergen-chip. **Methods**, 2014.
- MAHADY, A. *at al.* Histamine and antihistamines. Anaesthesia and Intensive Care Medicine, v. 9, n. 7, p. 324–328, 2008.

- MATSUOKA, T.; SHAMJI, M. H.; DURHAM, S. R. Allergen Immunotherapy and Tolerance. **Allergology International**, v. 62, n. 4, p. 403–413, 2013.
- MEADOWS, A. et al. A systematic review and economic evaluation of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy in adults and children with seasonal allergic rhinitis. **Health technology assessment (Winchester, England)**, v. 17, n. 27, 2013.
- MÖBS, C. et al. Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, 2010.
- MORENO, F. J.; CLEMENTE, A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? **The open biochemistry journal**, v. 2, p. 16–28, 2008.
- MRKIC, I. et al. Molecular characterization of recombinant Mus a 5 allergen from banana fruit. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 6, p. 498–506, 2014.
- OGUNNIYI, D. S. Castor oil: A vital industrial raw material. *Bioresour. Technol.* 97: 1086-1091, 2006
- PACHECO-SOARES. Expessão De Ric c 1, Um Importante Alérgeno De *Ricinus Communis*, Em *Escherichia Coli* e Mutações Em Seus Epitopos Alergênicos, **Dissertação de mestrado apresentado ao curso de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense**, 2014
- POMÉS, A. Common structures of allergens. **Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, v. 48, n. 3, p. 139–142, 2008.
- RING, J.; GUTERMUTH, J. 100 years of hyposensitization: History of allergen-specific immunotherapy (ASIT). **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, n. 6, p. 713–724, 2011.
- RUIZ, J.-L.; MITRA, S. Using cavity liners with direct posterior composite restorations. **Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, N.J.: 1995)**, v. 27, n. 6, p. 347–351; quiz 352, 2006.
- SACKESEN, C. *et al.* Suppression of B-cell activation and IgE, IgA, IgG1 and IgG4 production by mammalian telomeric oligonucleotides. **Allergy**, v. 68, n. 5, p. 593–603, 2013a.
- SACKESEN, C. et al. Suppression of B-cell activation and IgE, IgA, IgG1 and IgG4 production by mammalian telomeric oligonucleotides. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 68, n. 5, 2013b.
- SANTOS, A. F. *et al.* IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 5, p. 1249–1256, 2015.
- SHARMA, P. *et al.* Engineered hypoallergenic variants of osmotin demonstrate hypoallergenicity with in vitro and in vivo methods. **Molecular Immunology**, v. 64, n. 1, p. 46–54, 2015.
- STRATEGIES, I. 2 . Vaccine Development Development of Vaccines and Immunization Strategies. 1995.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, 1979.

VALENTA, R. *et al.* Recombinant allergens: What does the future hold? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 4, p. 860–864, 2011.

VALENTA, R. *et al.* Allergen-specific immunotherapy: From therapeutic vaccines to prophylactic approaches. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 2, p. 144–157, 2012.

VALENTA, R. *et al.* Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 2, p. 351–357, 2016.

VALENTA, R.; KRAFT, D. From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy Rudolf Valenta* and Dietrich Kraft. **Current Opinion in Immunology**, p. 718–727, 1991.

VALENTA, R.; NIEDERBERGER, V. Recombinant allergens for immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 4, p. 826–830, 2007.

WAMBRE, E. et al. Specific immunotherapy modifies allergen-specific CD4+ T-cell responses in an epitope-dependent manner. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 3, 2014.

WANG, X. Y. et al. Treatment of allergic rhinitis and urticaria: A review of the newest antihistamine drug bilastine. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 12, p. 585–597, 2016.

WOLLMANN, E. *et al.* Reduction in allergen-specific IgE binding as measured by microarray: A possible surrogate marker for effects of specific immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 3, p. 806–809.e7, 2015.

WOODFOLK, J. A. et al. Allergens, sources, particles, and molecules: Why do we make IgE responses? Allergology International, 2015.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 5, p. 620–634, 2012.

ZHENG, L. N. *et al.* Mapping IgE binding epitopes of major shrimp (Penaeus monodon) allergen with immunoinformatics tools. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2954–2960, 2011.

ZUIDMEER-JONGEJAN, L. *et al.* Development of a hypoallergenic recombinant parvalbumin for first-in-man subcutaneous immunotherapy of fish allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 166, n. 1, p. 41–51, 2015.

8- ANEXOS