

PRODUÇÃO DE ALÉRGENO MUTANTE RECOMBINANTE DE *Ricinus communis*, Ric c 3, E AVALIAÇÃO DA DESGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS E DO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE *Callosobruchus maculatus*

MARIANA GIAROLA BENEDITO BARTHOLAZZI

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro – 2018

PRODUÇÃO DE ALÉRGENO MUTANTE RECOMBINANTE DE *Ricinus communis*, Ric c 3, E AVALIAÇÃO DA DESGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS E DO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE *Callosobruchus maculatus*

MARIANA GIAROLA BENEDITO BARTHOLAZZI

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

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro – 2018

PRODUÇÃO DE ALÉRGENO MUTANTE RECOMBINANTE DE *Ricinus communis*, Ric c 3, E AVALIAÇÃO DA DESGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS E DO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE *Callosobruchus maculatus*

MARIANA GIAROLA BENEDITO BARTHOLAZZI

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

Aprovada em 20/02/2018

Comissão examinadora:

---

Dr. Bruno Lourenço Diaz – UFRJ

---

Dr<sup>a</sup>. Antônia Elenir Amâncio Oliveira - UENF

---

Dr<sup>a</sup>. Giliane Silva de Souza Cabral - UENF

---

Dr<sup>a</sup>. Olga Lima Tavares Machado – UENF (Orientadora)

*Dedico este trabalho aos meus pais, Andréa e Átila, meu esposo, Junior e a todos aqueles que me apoiaram e acreditaram que seria possível realizar esse sonho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que com toda sua Glória e Majestade, me ama e cuidou, em especial, de cada momento que passei nesses 2 anos. Obrigada Senhor, pois tudo que tenho, sou e vier a ser vem de Ti! A Ele toda a Honra, Glória e Louvor!

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Olga Lima Tavares Machado, que me recebeu com tanto carinho e me permitiu trilhar esse caminho sob suas instruções. Sua dedicação e amor pelo conhecimento é uma inspiração!

Aos meus pais, Andréa e Átila que sempre se esforçaram para me dar o melhor. Por sempre me incentivarem nos estudos e por acreditarem no meu esforço! Obrigada por todo amor e por “segurarem a corda” para que eu não precisasse desistir dos meus sonhos! Às minhas irmãs, Lara e Rebecca, por existirem em minha vida. Ela não seria a mesma sem vocês! E a todos da minha família, que mesmo estando distantes, sempre torceram por mim! Amo todos vocês!

Ao meu querido esposo, Junior, que me incentivou desde o início, mesmo sabendo das dificuldades que precisaríamos enfrentar. Por tudo que precisou abrir mão, as despedidas semanais, minhas ausências, choros e estresse, as saudades... nunca deixando de me dar força, compreensão e amor. Obrigada por viver comigo esse sonho! Sem seu apoio eu não teria conseguido. Te amo!

Ao Dr. André de Oliveira Carvalho, por ser mais que um colaborador, mas me instruir diretamente em cada experimento de Biologia Molecular, ensinando, não me deixando desanimar nas diversas tentativas e até mesmo colocando a “mão na massa” algumas vezes. Obrigada pela sua atenção e ensino!

A todos os alunos e funcionários do LFBM que me receberam e me ajudaram em tudo o que precisei durante o tempo que passei por lá. Mas em especial, agradeço a Dr<sup>a</sup>. Júlia Soares, por ter me acompanhado lado a lado, dedicando seu tempo para me ajudar a realizar os experimentos.

A Dr<sup>a</sup>. Antonia Elenir Amâncio Oliveira, por ter aberto as portas de seu laboratório e me cedido tudo que era necessário para realização do experimento com os insetos, além de sua atenção e ensinamentos a mim dispensados. Ao seu aluno Kayan Ventury, por sua disposição e paciência em me ajudar.

As queridas amigas de Laboratório! Jucélia Araújo, Thaís Pacheco, Débora Mothé, Lara Meneguelli, Francianne Galossi, Caroline Pessanha, Tatiana Morais e

Paula Barbosa, como foi especial ter conhecido vocês! Tenho certeza que Deus cuidou de cada detalhe para que eu pudesse vir e encontrar pessoas tão especiais! Obrigada por terem me recebido com tanto carinho, por me proporcionarem momentos tão especiais e terem sido ombro amigo quando precisei... Vocês fizeram eu me sentir em casa. Sou grata e feliz por poder chama-las de amigas!

A Thaís Pacheco, por ter contribuído diretamente com a execução desse trabalho. Sua disposição em me ensinar e ajudar, foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Obrigada por ter compartilhado comigo seus conhecimentos e me motivar nessa jornada!

Aos amigos, funcionários e professores do LQFPP, pelas amizades, ensinamento e companheirismo no meu dia a dia e aos vários amigos que fiz e compartilhei momentos aqui na UENF.

A minha amiga Efranci Ribeiro, que conhecendo meu sonho, me motivou a tentar. Por compartilhar comigo tantas alegrias, emoções, choros e orações para que pudéssemos estar aqui. Sua amizade foi um presente de Deus!

Aos meus vários amigos que acreditaram que realizar esse sonho era possível! Obrigada pela amizade, carinho e cada palavra de apoio! Em especial quero agradecer minha amiga Natália Alves, que me fortaleceu com suas orações e ombro amigo!

Aos meus sogros, Edvaldo e Elizabeth, pelo carinho de pais que sempre tiveram comigo e por todo o apoio que me deram para chegar até aqui. E a todos da família, que com alegria torceram por essa conquista!

A todos os meus irmãos em Cristo, que me sustentaram com suas orações! Seria injusto tentar citar nomes, acabaria esquecendo de alguém, mas sei o quanto vocês se preocupavam e torciam por mim! Sou grata a Deus pela vida de vocês!

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

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

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

*Provérbios 4:5*

## Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	10
<b>Resumo</b> .....	11
<b>Abstract</b> .....	12
<b>1. Introdução</b> .....	13
1.1. <i>Ricinus communis</i> (Mamoneira).....	13
1.2. Processo de desencadeamento da alergia .....	14
1.3. O Potencial alergênico das albuminas 2S de <i>Ricinus communis</i> .....	16
1.4. Albuminas 2S como inibidoras de $\alpha$ -amilase .....	18
1.5. A Tecnologia Recombinante no tratamento de alergias .....	19
<b>2. Objetivo Geral</b> .....	22
2.1. Objetivos específicos .....	22
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	23
3.1. Material Biológico .....	23
3.2. Desenho do Gene Sintético .....	23
3.3. Produção de células competentes de <i>E. coli</i> (linhagem XL-10).....	24
3.4. Transformação da cepa de clonagem com vetor pMA contendo Ric c 3 mutante em sistema de clonagem XL-10 .....	25
3.5. Extração e digestão plasmidial de <i>E. coli</i> – XL-10 transformada com mRic c 3 .....	26
3.6. Amplificação gênica e clonagem em vetor de expressão pET-32 EK-LIC.....	26
3.7. Transformação bacteriana em cepa de superexpressão – <i>E. coli</i> linhagem Rosetta-gami 28	
3.8. Indução da superexpressão de Ric c 3 mutante recombinante (mRic c 3) .....	29
3.9. Avaliação da expressão da proteína mRic c 3 .....	29
3.10. Extração da proteína mutante expressa .....	30
3.11. Obtenção da proteína expressa por Cromatografia de Fase Reversa em sistema HPLC	30
3.12. Isolamento de Ric c 3 mutante recombinante (mRic c 3) por Cromatografia de Fase Reversa em Sistema HPLC .....	31
3.13. Avaliação da alergenicidade de mRic c 3 .....	31
3.13.1. Obtenção de mastócitos.....	31
3.13.2. Ensaio de Desgranulação de Mastócitos .....	32
3.13.3. Avaliação do percentual de desgranulação por microscopia ótica.....	32
3.14. Avaliação efeito de mRic c 3 sobre desenvolvimento larval .....	32
<b>4. Resultados</b> .....	33

4.1.	Avaliação da clonagem em vetor de expressão pET-32 EK/LIC (produto da PCR)	33
4.2.	Avaliação da indução da superexpressão de mrRic c 3 .....	34
4.3.	Purificação de mrRic c 3 por Cromatografia de Fase Reversa (HPLC) .....	35
4.4.	Avaliação da Atividade Biológica de mrRic c 3.....	37
4.4.1.	Análise da atividade alergênica.....	37
4.4.2.	Análise do efeito sobre o desenvolvimento larval .....	38
<b>5.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>Referências</b> .....	<b>44</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Sequência de eventos observados numa resposta alérgica.....	16
<b>Figura 2:</b> Estrutura primária das isoformas de albumina 2S de <i>Ricinus communis</i> , Ric c 1 e Ric c 3. ....	18
<b>Figura 3:</b> Sequência gênica e proteica de mRic c 3 .....	24
<b>Figura 4:</b> Mapa do vetor pMA fornecido pela Invitrogen. ....	24
<b>Figura 5:</b> Sequência dos iniciadores usados para a ligação ao vetor pET-32 EK/LIC.....	27
<b>Figura 6:</b> Gel de agarose 1% corado com GelRed™ (proporção de 1:4) demonstrando o resultado de PCRs realizadas em diferentes condições de temperatura. ....	34
<b>Figura 7:</b> Análise da superexpressão de mRic c 3 por (A) SDS-PAGE 15% da indução da expressão da proteína mutante recombinante (mRic c 3) com IPTG e (B) <i>Western Blotting</i> tendo como espelho o SDS-PAGE da Indução.....	35
<b>Figura 8:</b> Cromatograma de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC .....	36
<b>Figura 9:</b> Sobreposição dos cromatogramas de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC.....	37
<b>Figura 10:</b> Ensaio de desgranulação de mastócitos.....	38
<b>Figura 11:</b> Média da massa corporal das larvas do inseto <i>C. maculatus</i> , alimentadas com sementes artificiais.....	39
<b>Figura 12:</b> Comparação entre larvas do inseto <i>C. maculatus</i> submetidas à alimentação com sementes artificiais contendo mRic c 3 (à direita) e em sementes controle – livres de mRic c 3 (à esquerda).....	39

## Resumo

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa que encontra condições apropriadas para o seu desenvolvimento no Brasil e diversos estudos vem sendo realizados para ampliar o seu uso. Porém, apesar das vantagens existentes no uso do óleo de ricino, há uma preocupação com o plantio desta oleaginosa, pois em suas sementes e pólen encontram-se substâncias tóxicas e alergênicas. Os principais alérgenos presentes na mamoneira são isoformas de proteínas pertencentes à classe das albuminas 2S (Ric c 1 e Ric c 3) que têm função de reserva e provavelmente estão associados à defesa da planta. O cultivo de mamoneiras pode gerar a sensibilização através do contato ou inalação dos seus alérgenos pelos trabalhadores. Atualmente, o tratamento para alergias em geral é a Imunoterapia, utilizando extratos naturais alergênicos, no entanto, tem-se observado que o uso desses extratos desencadeia reações alérgicas pelos contaminantes ali presentes, apresentando contra-indicações. Embasados nos conhecimentos das estruturas de Ric c 1 e Ric c 3 e na determinação de epitopos ligantes de IgE, neste trabalho produzimos uma proteína mutante recombinante, mrRic c 3, hipoalergênica, empregando técnicas de DNA recombinante. Para avaliar a atividade alergênica, foram realizados testes de desgranulação de mastócitos isolados de ratos Wistar. Observamos uma redução na desgranulação para níveis similares ao controle negativo. Sabe-se que as isoformas de albuminas 2S de *R. communis* (Ric c 1 e Ric c 3) são inibidoras de  $\alpha$ -amilase de insetos, estando associada à defesa da planta, atividade que deveria ser preservada na proteína recombinante mutante. Para avaliar a manutenção da atividade de defesa, mrRic c 3 foi incorporada em sementes artificiais para alimentar larvas de *C. maculatus*. Verificamos que as larvas não se desenvolveram de forma eficiente nestas sementes, quando comparadas com aquelas crescidas em sementes artificiais controles. Espera-se que a produção de recombinantes hipoalergênicos possa abrir novas perspectivas para indivíduos alérgicos não somente à mamona, mas também a componentes como milho, camarão, amendoim, gergelim e outras substâncias que apresentaram respostas cruzadas de alergia com alérgenos da mamona.

**Palavras-chave:** Albuminas 2S, Ric c 3, Recombinante Hipoalergênico, Inibição  $\alpha$ -amilase

## Abstract

Castor oil plant (*Ricinus communis* L.) is an oilseed which is available to extend its use. However, despite the advantages in the use of castor oil, there is a concern with the planting of this oilseed, because in its seeds and pollen are toxic and allergenic substances. The major allergens present in the castor oil plant are isoforms of proteins belonging to the class of 2S albumins (Ric c 1 and Ric c 3) that have a reserve function and are probably associated with plant defense. The cultivation of castor oil plant can generate sensitization through the contactor inhalation of their allergens by the workers. Currently, the treatment for allergies in general is immunotherapy, using natural allergenic extracts, however, it has been observed that the use of these extracts triggers allergic reactions by the contaminants present, presenting contraindications. Based on the knowledge of the Ric c 1 and Ric c 3 structures and the determination of IgE ligand epitopes, in this work we produced a recombinant mutant protein, mrRic c 3, hypoallergenic, using recombinant DNA techniques. To evaluate the allergenic activity, mast cell degranulation tests isolated from Wistar rats were performed. We observed a reduction in degranulation to levels similar to the negative control. It is known that 2S isoforms of *R. communis* (Ric c 1 and Ric c 3) are inhibitors of insect  $\alpha$ -amylase, being associated with plant defense, an activity that should be preserved in the recombinant mutant protein. To evaluate the maintenance of the defense activity, mrRic c 3 was incorporated in artificial seeds to feed *C. maculatus* larvae. We verified that the larvae did not develop efficiently in these seeds, when compared to those grown in control artificial seeds. Hypoallergenic recombinant production is expected to open new perspectives for allergic individuals not only to castor oil but also to components such as corn, shrimp, peanut, sesame, and other substances that have cross-allergy responses to castor allergens.

**Keywords:** 2S Albumins, Ric c 3, Hypoallergenic recombinant,  $\alpha$ -amylase inhibition

## 1. Introdução

### 1.1. *Ricinus communis* (Mamoneira)

Pertencente à família *Euphorbiaceae*, a mamoneira (*Ricinus communis*) pode ser encontrada em todos os países de clima temperado do mundo e por ser uma planta de fácil cultivo e resistente à escassez de água, encontra ótimas condições para o seu desenvolvimento no Brasil, principalmente no extenso semiárido nordestino (SCHOLZ & DA SILVA, 2008; BELTRÃO et al., 2009).

A mamoneira é encontrada na forma de árvore ou arbusto, podendo chegar a 10 metros de altura e a uma idade de 4 anos. Atualmente, as variedades cultivadas crescem cerca de 60-120 cm de altura/ano e a vários metros em cultivos perenes (SCHOLZ & DA SILVA, 2008).

A mamona é o fruto da mamoneira e de suas sementes são extraídos o óleo, que possui um mercado internacional crescente por sua extensa aplicabilidade, incluindo o uso em cosméticos, na fabricação de plásticos e lubrificantes. Além disso, com a diminuição dos combustíveis fósseis e as incertezas sobre a sua disponibilidade, muitas pesquisas são realizadas com o intuito de tornar viável o uso do óleo de rícino na produção de Biodiesel (AZAM et al., 2005; AZEVEDO & BELTRÃO, 2007).

Como coproduto da extração do óleo, temos a torta da mamona, uma massa orgânica que fica retida no filtro após prensagem e que apesar de rica em nitrogênio, fósforo e potássio, não pode ser utilizada como alimento, nem como aditivo proteico para ração animal, pois apresenta também substâncias tóxicas, como a proteína ricina, o alcaloide ricinina, e um conjunto de proteínas alergênicas (SEVERINO, 2005; AZEVEDO & BELTRÃO, 2007).

As substâncias alergênicas presentes na torta e no pólen da mamona, são isoformas da família das albumina 2S (Ric c 1 e Ric c 3), que apresentam funções de reserva e defesa da planta (NASCIMENTO, 2009).

O crescente interesse comercial e, conseqüentemente o aumento no cultivo de mamoneiras, pode aumentar a sensibilização, através do contato ou inalação dos alérgenos da mamona pelos trabalhadores e pela população que vive próximo das plantações ou das usinas de extração. Com isso, o entendimento a fim de diminuir

seu potencial alérgico é de grande interesse, visando à saúde do grupo populacional envolvido.

## **1.2. Processo de desencadeamento da alergia**

Alergia é o termo utilizado na medicina clínica para descrever as reações de hipersensibilidade imediata, que é quando o sistema imune sofre alguma alteração com rápido aparecimento de sintomas, devido a presença de um antígeno ou alérgeno (EL-AGAMY, 2007; ABBAS et al., 2015).

A hipersensibilidade do tipo I (imediata) ou alergia, é desencadeada por anticorpos IgE específicos, sendo o tipo mais prevalente de hipersensibilidade (ABBAS et al., 2015).

Encontrados no ambiente ou nos alimentos, os alérgenos são substâncias que apresentam propriedades moleculares distintas, como a de sensibilizar, isto é, induzir a produção de anticorpos da classe IgE pelo sistema imune, propriedade de ligação aos anticorpos IgE e de ativação da reação alérgica em indivíduos sensibilizados (AALBERSE, 2000).

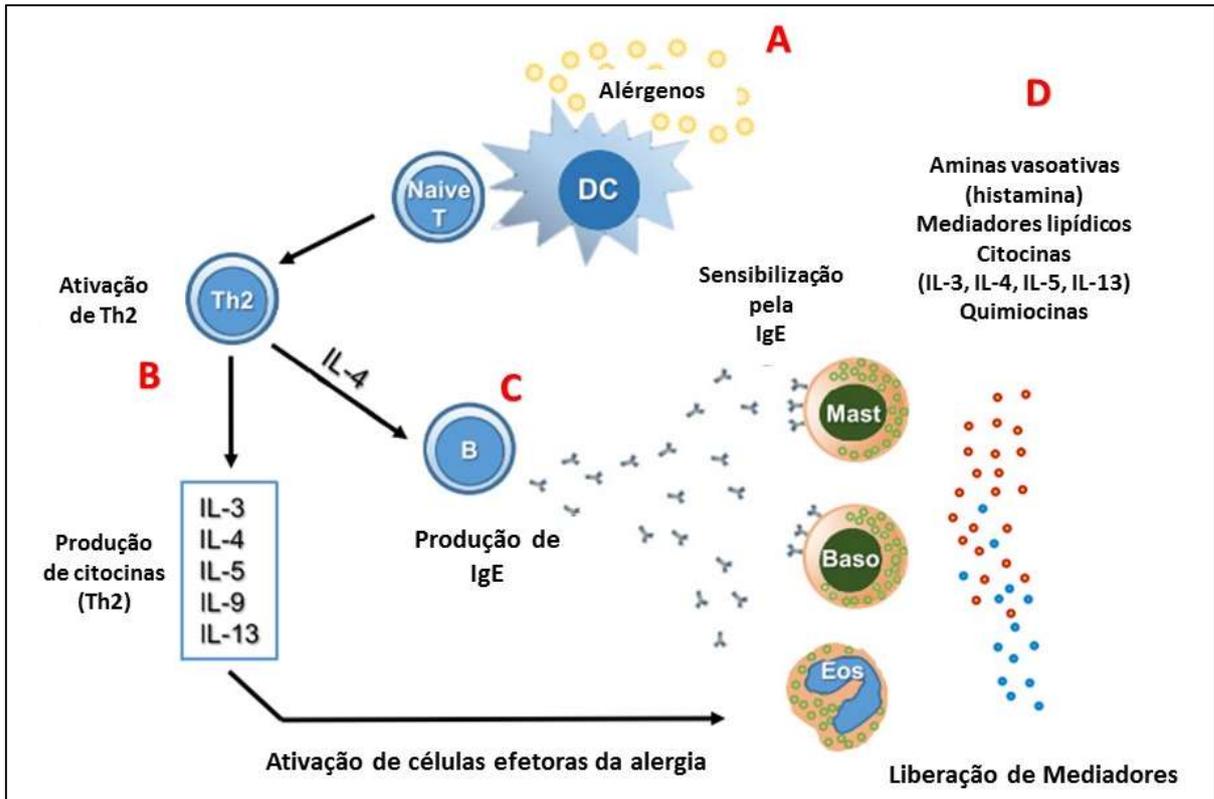
As manifestações das respostas alérgicas acontecem de forma diferente de um organismo para outro. Indivíduos atópicos apresentam predisposição genética a se sensibilizarem mais facilmente, desencadeando maiores títulos de IgEs no sangue que os não atópicos, aumentando assim o reconhecimento do antígeno pelo organismo e os sintomas da alergia. Além disso, a dose, o tipo e a via de exposição ao alérgeno e apresentação para o sistema de imune, podem desempenhar o papel do desencadeamento de reações alérgicas (LEUNG et al., 2003; OZDEMIR et al., 2016).

A reação alérgica se inicia quando um indivíduo entra em contato com o alérgeno, através da inalação, ingestão ou contato com a pele e este é reconhecido pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) que endocitam este alérgeno sofrendo clivagem proteolítica. Os fragmentos peptídicos que serão gerados são conhecidos como epitopos de células T. Esses epitopos são direcionados para a membrana externa das APCs e apresentados via MHC de classe II às células T CD4<sup>+</sup>, que se diferenciarão em células num padrão T<sub>H</sub>2 (ABBAS et al., 2015; OZDEMIR et al., 2016).

As células T<sub>H2</sub> ativadas irão induzir, através das citocinas, a produção de anticorpos pelos linfócitos B, dando início a uma resposta alérgica. As citocinas são responsáveis por muitas características da hipersensibilidade imediata, a alta produção de interleucinas 4 (IL-4) pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (T<sub>H2</sub>) induz a troca de classe nos linfócitos B para produzirem IgE específica. Por sua vez, estes anticorpos IgE são liberados pelos plasmócitos se associando aos receptores específicos (FcεRI) presentes na superfície de mastócitos encontrados no tecido, ou de basófilos circulantes no sangue. Assim, ocorre a primeira sensibilização (ABBAS et al., 2015; HOLGATE & POLOSA, 2008).

A resposta alérgica é observada após uma nova exposição ao mesmo alérgeno, conhecida como segunda sensibilização ou reestimulação. Nessa etapa ocorrerá ligação cruzada entre os epítopos presentes no alérgeno com as moléculas de IgE previamente fixadas na superfície dos mastócitos e basófilos. Nesta etapa, os mastócitos e basófilos sensibilizados liberam seus mediadores localizados nos grânulos intracelulares e também sintetizam novos mediadores bioativos, como histaminas, proteases e citocinas, causando sintomas e sinais de reações de hipersensibilidade de tipo I de fase aguda alérgica (AKDIS, 2006; OZDEMIR et al., 2016) (Figura 1).

A IgE é capaz de reconhecer regiões específicas presentes no alérgeno, denominada epítopo. Epítopos são regiões de interação do alérgeno com as IgEs, podendo ser conformacionais, resultantes do arranjo estrutural da molécula ou contínuos, onde a sequência primária contínua pode desencadear a resposta alergênica no indivíduo previamente sensibilizado (IVANCIUC et al., 2009). Apesar desta especificidade de ligação, alérgeno-IgE específica, pode ocorrer fenômenos de reações cruzadas entre a IgE e outras substâncias que possuem epítopos multivalentes (BUFE, 2001; FELIX, 2006).



**Figura 1:** Sequência de eventos observados numa resposta alérgica. (A) Primeiro o alérgeno é apresentado pelas células dendríticas (DC), as células T não primadas ou “naive” precursoras que se diferenciam para o fenótipo  $T_H2$ . (B) Células  $T_H2$  são induzidas devido à presença de IL-4. Estas células produzem citocinas do padrão de resposta  $T_H2$ . (C) Os linfócitos B são induzidos a trocarem de classe e produzirem IgE, que se ligam aos receptores específicos ( $Fc^\epsilon RI$ ) presentes na superfície dos mastócitos e basófilos, fase denominada de sensibilização. (D) A exposição repetida ao alérgeno leva a uma segunda sensibilização do organismo e ligação-cruzada, ocorrendo a desgranulação dos mastócitos e basófilos, conduzindo aos sintomas da hipersensibilidade imediata. Extraído e adaptado de Ozdemir et al., (2016).

### 1.3. O Potencial alergênico das albuminas 2S de *Ricinus communis*

As albuminas 2S são caracterizadas como principais alérgenos da castanha do Pará, nozes, mostarda, gergelim e da mamona, podendo ser encontradas nas sementes, frutos e pólen (BREITENEDER & MILLS, 2005).

Em sementes, as albuminas 2S são encontradas em corpos proteicos e são mobilizadas durante a germinação. Sua massa molecular varia de 12-15 kDa sendo geralmente composta por duas cadeias polipeptídicas (isoformas) ligadas por duas pontes dissulfeto. Essas isoformas foram descritas como Ric c 1 e Ric c 3 e são originadas a partir de processamento pós-traducional de um único precursor, contendo 237 resíduos de aminoácidos (YOULE & HUANG, 1978; IRWIN et al., 1990).

A isoforma Ric c 1 apresenta baixo peso molecular, com alto teor de glutamina e composta por duas cadeias polipeptídicas ligadas por ponte dissulfeto, uma cadeia leve (34 resíduos de aminoácidos) e outra cadeia pesada (61 resíduos). As isoformas Ric c 3 também tem baixo peso molecular, alto teor de glutamina e com duas cadeias polipeptídicas, sendo a cadeia leve composta por 41 resíduos de aminoácidos e a cadeia pesada por 67 resíduos, ligadas por duas pontes dissulfeto (DA SILVA et al., 1996).

Os alérgenos de origem vegetal são classificados com base na sua estrutura e função, sendo os mais abundantes encontrados nas superfamílias Cupin e Prolamina. As isoformas Ric c 1 e Ric c 3 são classificadas na superfamília das prolaminas, que apresentam um esqueleto conservado de 8 resíduos de cisteínas (C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C) em sua sequência, formando 4 pontes dissulfeto. A presença do “motif” CC e CXC no esqueleto conservado, não é comum em proteínas, o que facilita a identificação dos membros dessa superfamília (KREIS et al., 1985; SHEWRY et al., 2002).

Epitopos responsáveis pelo desencadeamento da alergia (Figura 2) foram identificados nos alérgenos de *R.communis*, sendo dois em Ric c 1 e quatro em Ric c 3. Nos epitopos ligantes de IgE dessas isoformas é importante que haja 2 resíduos de ácidos glutâmicos (E) a uma distância de no máximo 12 resíduos para que ocorra a ligação com as IgEs presentes na membrana dos mastócitos e/ou basófilos. Esta interação dispara o processo de desgranulação destas células, desencadeando os sintomas da alergia (FELIX, 2007; DEUS-DE-OLIVEIRA et al., 2011).

Além das diversas plantas possuírem albuminas 2S, muitos alérgenos semelhantes aos da classe das albuminas 2S estão presentes em algumas fontes animais como peixe e camarão. A similaridade estrutural das proteínas pode promover reações cruzadas entre diferentes IgEs e tais alérgenos. Estudo “*in vitro*” utilizando mastócitos sensibilizados com IgE anti-albuminas 2S de mamona, demonstrou que esses podem sofrer desgranulação quando expostos a alérgenos inaláveis, como poeira, fungos e tabaco e, também quando expostos a componentes alergênicos presentes em alimentos como camarão, peixe, glúten, trigo, soja, amendoim e milho (FELIX, 2008).



Como forma de defesa contra a ação e o ataque de insetos, as plantas desenvolveram estratégias produzindo inibidores de enzimas digestivas, entre eles os inibidores de  $\alpha$ -amilases (MELLO & SILVA-FILHO, 2002).

Os inibidores de  $\alpha$ -amilase apresentam especificidade pela enzima alvo, sendo assim, alguns inibidores apresentam alta afinidade por  $\alpha$ -amilase de insetos e mamíferos. A forma como esses inibidores interagem com os resíduos catalíticos da enzima apresenta enormes variações. A interação entre o inibidor e o sítio catalítico da enzima pode ser via ligação de hidrogênio direta, ou via uma molécula de água, ou envolvendo uma molécula de  $\text{Ca}^{+2}$  hidratado, ou ainda, alguns inibidores apresentam interações que mimetizam a interação do substrato com a enzima (SILVA et al., 1999; FRANCO et al., 2002; SVENSSON et al., 2004).

Estudos revelaram que as albuminas 2S de *Ricinus communis* contêm um domínio característico ao dos pertencentes à família de inibidores de tripsina/  $\alpha$ -amilase, sugerindo seu papel de resistência contra insetos (MELLO & SILVA-FILHO, 2002).

Modelo *in silico* da interação entre a  $\alpha$ -amilase de *Tenebrio molitor* e as isoformas Ric c 1 e Ric c 3, desenvolvido por Nascimento (2011), demonstrou a associação direta entre as isoformas e o sítio ativo da enzima, o que promove a inibição da enzima por competição com o substrato (amido). Além disso, essas isoformas foram caracterizadas como inibidores de  $\alpha$ -amilases dos besouros *T. molitor*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (NASCIMENTO et al., 2011).

### **1.5. A Tecnologia Recombinante no tratamento de alergias**

A prevalência das alergias mediadas por IgE tem aumentado mundialmente devido a mudanças no estilo de vida, epigenética e o aumento na disseminação de alérgenos devido a mudanças climáticas (STEFAN et al., 2017).

De acordo com o Livro Branco da Organização Mundial de Alergia (WAO - 2013), cerca de 30 a 40% da população mundial sofre com um ou mais tipos de alergia. Tanto a gravidade quanto a complexidade das doenças alérgicas, particularmente em crianças e adultos jovens, tem aumentado, gerando problemas

sociais e econômicos significativos para os indivíduos e a sociedade (CANONICA et al., 2013).

Diversas estratégias são utilizadas no tratamento de doenças alérgicas. Atualmente, a opção de terapia estabelecida para o tratamento de alergias é a Imunoterapia alérgeno-específica, conhecida como AIT (*Allergen-specific immunotherapy*), onde se utiliza extratos naturais de alérgenos (STEFAN et al., 2017).

O primeiro estudo de Imunoterapia alérgeno-específica foi realizado por Leonard Noon (1911), injetando extrato de pólen de gramíneas em pacientes alérgicos. Neste estudo pôde-se observar a redução dos sintomas e maior tolerância ao alérgeno por quase 1 ano. Posteriormente, em 1935, baseado nas pesquisas de Noon, Cooke e sua equipe, após ensaios clínicos bem-sucedidos nos Estados Unidos, publicaram um trabalho demonstrando que as imunoterapias alérgeno-específicas (AIT) induzem a proteção ao alérgeno específico (apud VALENTA et al., 2011).

No entanto, a utilização destas imunoterapias não tem se mostrado conveniente pois, apresenta baixa qualidade, um regime de tratamento de vários anos e efeitos colaterais alérgicos graves (STEFAN et al., 2017).

Estratégias imunoterápicas a fim de melhorar o tratamento de doenças alérgicas estão sendo estudadas. Estas incluem o uso de diferentes adjuvantes, peptídeos derivados de alérgenos que combinam reatividade de células T preservadas com capacidade reduzida para ativar células B, e alérgenos recombinantes mais bem definidos ou derivados hipoalergênicos (JUTEL & AKDIS, 2014).

Com o advento da tecnologia de DNA recombinante, estudos oferecendo a oportunidade de modificar moléculas alergênicas em derivados hipoalergênicos vem sendo feitos e, cada vez mais recombinantes estão sendo produzidos para uso em imunoterapias específicas (GERALDINI et al., 2008; ZUIDMEER-JONGEJAN et al., 2015).

Estudo de AIT subcutânea em pacientes alérgicos ao pólen de Bétula utilizando o alérgeno recombinante (rBet v 1), demonstrou ser igualmente eficaz ao extrato natural (nBet v 1). Porém, o recombinante mantinha as propriedades alergênicas, e os pacientes precisavam ser tratados com pequenas doses de

injeções mensais (PAULI et al., 2008). Apesar de oferecem a vantagem de atender as exigências farmacêuticas de produção de imunoterápicos, os efeitos colaterais permaneceram semelhantes ao dos extratos alergênicos naturais, tornando necessárias pequenas doses mensais para o tratamento (VALENTA et al., 2016).

De acordo com Linhart & Valenta (2012), uma estratégia para reduzir os efeitos colaterais no decorrer das imunoterapias é usar a engenharia genética para transformar alérgenos em derivados hipoalergênicos recombinantes. A ideia básica por trás da construção de derivados hipoalergênicos recombinantes é que esse apresente reatividade a IgE reduzida e mantenha atividade alergênica que seja capaz de modular o sistema imune. Essa redução pode ser obtida através de mutação dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação do epítopo com a IgE (VRTALA et al., 2000; VALENTA et al., 2010;).

Estudo de modelagem molecular *in silico*, demonstrou ser viável realizar mutações nos resíduos de ácidos glutâmicos (E) dos epitopos alergênicos das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, por resíduos de leucina (L). De acordo com Nascimento (2009), essas mutações tornariam as isoformas menos alergênicas, mantendo preservada sua atividade de inibição de  $\alpha$ -amilase.

A partir desse estudo, Pacheco-Soares et al., (2018) estabeleceram condições que possibilitaram a expressão em sistema bacteriano com *Escherichia coli* da isoforma alergênica Ric c 1 e também da Ric c 1 mutante, como proposto por Nascimento (2009).

A produção de recombinante expressando mutações específicas na isoforma Ric c 3 das albuminas 2S de mamona, é o objetivo principal deste trabalho e permitirá abrir o caminho para novas abordagens terapêuticas de imunização para indivíduos que sofrem com alergia.

## **2. Objetivo Geral**

Produzir Ric c 3 recombinante contendo mutações em aminoácidos pontuais, em um sistema de expressão com *Escherichia coli*, a fim de minimizar a alergenicidade e conservar a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Produzir uma proteína recombinante, derivada de Ric c 3, contendo mutações em seus epítopos alergênicos (mrRic c 3);
- Avaliar a atividade alergênica de mrRic c 3;
- Avaliar efeito de mrRic c 3 sobre o desenvolvimento larval do inseto *Callosobruchus maculatus*;

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Material Biológico

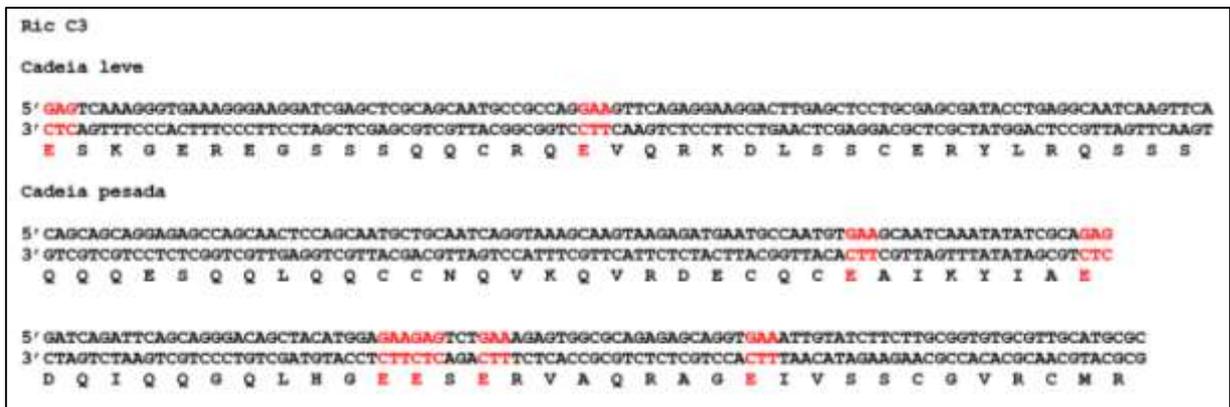
- Vetor de clonagem pMA contendo o gene sintético de Ric c 3 com as mutações em aminoácidos específicos, adquirido comercialmente (Invitrogen).
- Cepa ultracompetente *E. coli* - XL-10, genótipo: TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr], adquirida comercialmente (Stratagene).
- Cepa de *E. coli* - Rosetta-gami<sub>2</sub> (DE3) pLysS, genótipo: D (ara-leu)7697DlacX74 DphoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac+lacIq pro]gor522::Tn10 trxBpLysSRARE23 (Cam<sub>R</sub>, Str<sub>R</sub>, Tet<sub>R</sub>)<sub>4</sub>], adquirida comercialmente (Novagen).
- Ratos Wistar, obtidos do Biotério da Universidade Estadual do Norte Fluminense– UENF, sob aprovação do Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA – UENF), protocolo nº 297.
- Besouros *C. maculatus*, cedido pelo grupo colaborador do Laboratório de Química e Função de Proteína e Peptídeo – LQFPP, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.

#### 3.2. Desenho do Gene Sintético

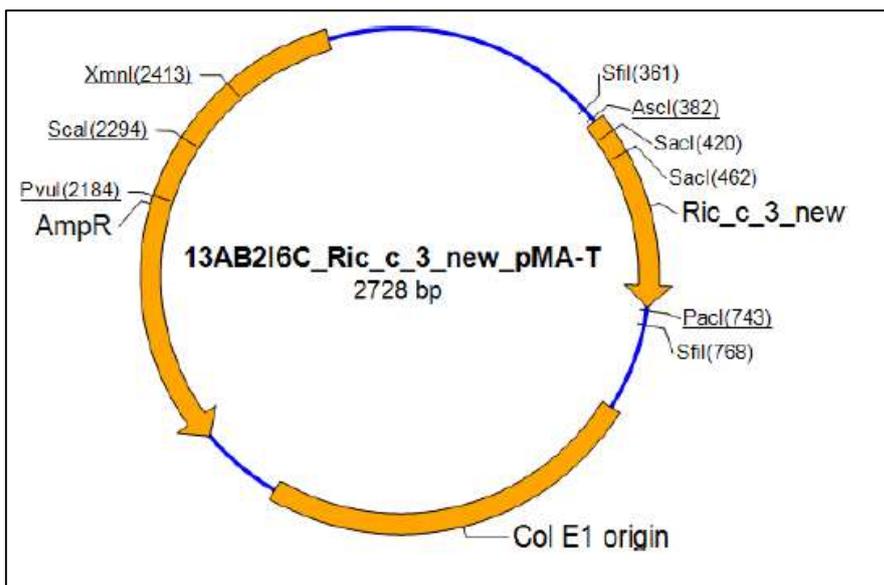
A sequência codificante de Ric c 3 desenhada para conter as mutações nos epitopos alergênicos, troca de resíduos de ácido glutâmico (E) por leucina (L), como sugerido por modelagem molecular descrita por Nascimento (2009), foi sintetizado pela ferramenta GeneArt (Invitrogen) (Figura 3).

A empresa após a síntese da sequência codificante mutante de Ric c 3 (mRic c 3) fez a ligação desta no vetor pMA verificando se a sequência estava correta, por sequenciamento de nucleotídeo. Assim, a empresa fornece a sequência codificante de mRic c 3 ligada ao vetor pMA (construção mRic c 3-pMA) (Figura 4).

As etapas de transformação bacteriana, clonagem em vetor e indução da expressão da proteína recombinante (itens 3.3 a 3.8) foram realizadas em colaboração com o Dr. André de Oliveira Carvalho, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos (LFBM) – UENF.



**Figura 3:** Sequência gênica e proteica de mRic c 3, em vermelho estão destacados os resíduos de Ácido glutâmico (E) que serão trocados por leucina (L).



**Figura 4:** Mapa do vetor pMA fornecido pela Invitrogen.

### 3.3. Produção de células competentes de *E. coli* (linhagem XL-10)

A construção mRic c 3-pMA foi usada para transformar cepa de *E. coli* competente, linhagem XL-10, para manutenção e propagação da construção.

Para tanto, cultura fresca contendo colônias de *E. coli*, linhagem XL-10, foi inoculada em um tubo contendo 20 mL de meio LB líquido, ficando incubado por 16 h a 37°C a 250 rpm. Após este período de incubação, foram retiradas alíquotas de 150 µL e transferidas para 100 mL de novo meio LB líquido e, uma nova incubação a 37°C por 2 h a 250 rpm foi realizada para que a cultura alcançasse a densidade ótica (D.O.<sub>600</sub>) entre 0,5 – 0,7, necessária para o preparo das células competentes. Ao alcançar a D.O., o tubo foi transferido para um banho de gelo por 10 minutos e centrifugado a 2.500 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo células foi ressuscitado em 20 mL de solução salina (10 mM de PIPES, pH 6,7, 55 mM de MgCl<sub>2</sub>, 15 mM de CaCl<sub>2</sub> e 250 mM KCl) e, essa suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi mais uma vez descartado e o sedimento de células foi suspenso em 10 mL da solução salina acrescido de 375 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 100%. As células foram homogeneizadas levemente e incubadas por 10 minutos no gelo. Após essa incubação, mais 375 µL de DMSO 100% foram adicionados e, a suspensão de células foi novamente homogeneizada. Alíquotas de 200 µL foram transferidas para tubos de microcentrífuga autoclavados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, antes de serem armazenadas em freezer a - 70 °C.

### **3.4. Transformação da cepa de clonagem com vetor pMA contendo Ric c 3 mutante em sistema de clonagem XL-10**

Para a transformação da cepa XL-10 competente, foi utilizada a construção mRic c 3-pMA anteriormente descrita na Figura 4. Para isso, 4 µg do vetor (construção mRic c 3-pMA) foram incubados em 200µl de células competentes onde permaneceram por 10 minutos no gelo. Posteriormente este material foi transferido para 42 °C por 90 segundos e, novamente, foram transferidas para o gelo por mais 10 minutos. Esse processo foi feito rapidamente para ocorrer o choque térmico e a construção fosse capaz de ser inserida na célula por desestabilização da membrana plasmática da célula bacteriana. Posteriormente, foram adicionados 800 µL de meio LB líquido às células sendo incubadas por 1 h a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após a fase de crescimento, as células foram centrifugadas, o sobrenadante

descartado e o precipitado de células ressuspensionado e plaqueado com auxílio da alça de Drigalsky em meio LB sólido contendo 100 µg/ mL de ampicilina. Estas placas de Petri foram mantidas a 37 °C por 16 h e, após esse período foram avaliadas afim de identificar a presença de colônias transformadas. As colônias transformadas foram selecionadas e inoculadas em 20 mL de meio LB líquido contendo ampicilina por 16h a 37 °C.

### **3.5. Extração e digestão plasmidial de *E. coli* – XL-10 transformada com mRic c 3**

Após o período de crescimento das células transformadas em meio LB (etapa 3.4), foi feita a extração plasmidial de cada colônia. Para a extração plasmidial, um volume de 750 µL de cultura celular foi transferida para tubos. Esta suspensão foi centrifugada por 30 segundos a 15.000 g. Todas as centrifugações foram em temperatura ambiente, aproximadamente 25°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e, as células foram ressuspensionadas pela adição de 300 µL de solução TENS (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 100 mM de NaOH, 25 mM de SDS) sob agitação vigorosa por 10 segundos. Em sequência, foi adicionado 150 µL de acetato de sódio (1,5 M), seguido de centrifugação por 3 minutos a 15.000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 1 mL de etanol (100%) gelado e este foi centrifugado por 1 minuto a 15.000 g. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol (70%) gelado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco e, posteriormente, ressuspensionado com 40 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA) contendo RNase a 40 ng/µL e incubado a 37 °C por 1 h.

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

Para clonar a sequência gênica de mRic c 3 em um sistema de expressão bacteriano, foi necessário primeiro ligar esta sequência em um vetor de expressão. Foi utilizado o vetor de expressão pET-32 EK-LIC (Novagem). Este vetor possui características particulares importantes para que ocorra a produção da proteína de

interesse, dentre elas: o 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, este vetor possui uma sequência de nucleotídeos que adiciona a proteína expressa uma sequência de histidinas consecutivas, que facilita o reconhecimento da mesma. As proteínas recombinantes expressas neste vetor são ainda fusionadas à tioredoxina, que ajuda na solubilidade da proteína recombinante e ajuda a evitar a formação de corpos de inclusão.

Para a clonagem no vetor pET, foram desenhados manualmente os iniciadores com a sequência de nucleotídeos específica e necessária para a ligação de mRic c 3 ao vetor. Suas propriedades físicas como, temperaturas de anelamento, assim como sua capacidade de auto-complementaridade e porcentagem de C/G foram analisadas utilizando a ferramenta *online* OligoCalc (Figura 5).

<p><b>mRic c 3</b></p> <p><b>Sense</b></p> <p>5' <b>GACGACGACAAGATG</b>TTGTCAAAGGGTGAAAGGTTGG 3'</p> <p>Tm: 49 °C, CG: 40%</p> <p><b>Anti- sense</b></p> <p>3' CACACGCAACGTACGCGTCA<b>TGGCCCGAAGAGGAG</b> 5'</p> <p>Tm: 70.19 °C, CG: 65, 62%</p>
---

**Figura 5:** Sequência dos iniciadores usados para a ligação ao vetor pET-32 EK/LIC. Em vermelho é mostrado em ambos os iniciadores, a sequência que anela com o vetor e em preto é mostrada a sequência que anela com a região codificante de mRic c 3. Abaixo de cada iniciador é mostrada a Temperatura (Tm) e a porcentagem de CG.

O PCR (pET) foi realizado de acordo com o quadro 1, abaixo. As quantidades apresentadas referem-se a 1 reação em cadeia da polimerase, resultando num volume total de 20 µL.

**Quadro 1:** Quantidade e ordem dos materiais utilizados para o PCR (pET)

Tampão 5x	dNTP	sense	Anti-sense	MgCl <sub>2</sub>	DMSO	Taq Phusion	H <sub>2</sub> O	DNA	Volume Total
4 µl	0,4 µl	2 µl	2 µl	0,4 µl	0,6 µl	0,2 µl	10,4µl	1 µl	20µl

Condição:

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

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

Após a PCR foi realizado um tratamento do produto amplificado com a T<sub>4</sub> DNA polimerase da seguinte forma: 2 µL do produto amplificado, Tampão T<sub>4</sub> DNA polimerase 1x, ATP 25 mM, DTT 1 mM, T<sub>4</sub> DNA polimerase 0,1 u/µL, completando o volume para 10 µL com água ultrapura. A reação foi incubada a uma temperatura de 22 °C por 15 minutos e inativada a 72 °C por 20 minutos. Após o tratamento, o fragmento se encontra pronto para o anelamento ao vetor pET-32 EK-LIC.

Para a reação de anelamento ao vetor pET-32 EK-LIC, realizou-se a seguinte sequência experimental: 0,5 µL do vetor pET-32 EK-LIC e 2 µL do produto de reação do fragmento tratado com a T<sub>4</sub> DNA polimerase equivalente a 100 ng/ µL, foram incubados por 5 minutos a 22 °C. Em seguida foi adicionado 1 µL de EDTA e 0,5 µL de água ultrapura e uma nova incubação nas mesmas condições anteriores. Após estas etapas obtivemos, portanto, a construção mRic c 3-pET.

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

A célula hospedeira que foi utilizada para a superexpressão da sequência é a *E. coli* linhagem Rosetta-gami<sub>2</sub> (DE<sub>3</sub>) pLysS, pois ela possui característica necessária para a ativação da transcrição pela T7 RNA polimerase.

O processo de transformação seguiu o mesmo utilizado para a transformação da *E. coli* – XL-10 (item 3.4), porém o vetor utilizado na transformação foi a construção obtida, mRic c 3-pET (item 3.6).

### **3.8. Indução da superexpressão de Ric c 3 mutante recombinante (mrRic c 3)**

Primeiramente, foram inoculadas 2 colônias isoladas de *E. coli* linhagem Rosetta-gami2 (DE3) pLysS transformadas com a construção mRic c 3-pET em 250 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). As cepas foram mantidas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 3 horas, até atingir a D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,5. Após o crescimento, foi retirado 1 mL de cada amostra para o controle no Tempo 0. Depois, foi adicionado 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosida) às culturas, para ativar o processo de indução da tradução de mRic c 3 recombinante (mrRic c 3). A cultura que não teve adição de IPTG foi avaliada como controle negativo. Todas as culturas foram agitadas a 200 rpm e mantidas a 37 °C por 16 horas.

### **3.9. Avaliação da expressão da proteína mrRic c 3**

A fim de confirmar a expressão de mrRic c 3 pela *E. coli*, foram realizadas Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 15% e *Western Blotting* com anticorpo policlonal anti-albuminas 2S.

Inicialmente, foi realizado eletroforese (SDS-PAGE 15%) conforme descrito por Laemmli (1970). Foi aplicado ao gel uma alíquota (30 µL do precipitado da indução) das amostras que foram submetidas a indução por IPTG e sem adição de IPTG. A corrida foi realizada a 120 V e 400 mA.

Após a corrida, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose para realização da técnica de *Western Blotting* (TOWBIN et al., 1979). A transferência foi realizada em sistema semi-seco em um “sanduíche” de papel filtro embebido em tampão de transferência (20 mM de Tris, 145 mM de glicina e metanol 20%) sob uma corrente de 1 mA para cada cm<sup>3</sup> da membrana, por 2 horas.

Após a transferência, a membrana foi embebida em tampão bloqueador (0,1 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15 M de NaCl e 2% de leite em pó desnatado) por um período de 1 h. Posteriormente, foi diluído no tampão bloqueador o anticorpo primário policlonal anti-albumina2S de mamona gerado em coelho e incubado por 18 h a 4 °C. Em

seguida a membrana foi lavada 10 vezes em PBS (0,1 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15 M de NaCl), com duração de 5 minutos por lavagem. Após, a membrana foi incubada por 2 h com anticorpo secundário anti-coelho conjugado a peroxidase diluído no tampão bloqueador. A revelação foi feita utilizando solução contendo DAB (Diaminobenzidina 99% - Aldrich®), 2 M de Tris/HCl pH 7,5, 0,1 M de Imidazol, peróxido de hidrogênio e água ultrapura. A reação ocorreu sob o abrigo de luz.

### **3.10. Extração da proteína mutante expressa**

A extração da fração expressa (mrRic c 3) após a indução e confirmação por *Western Blotting*, foi feita utilizando o reagente CellLytic B 10x – Sigma-Aldrich®. Este método foi escolhido por resultar numa extração rápida e eficiente de proteínas recombinantes a partir de *E. coli*. Foram utilizados 500 µL de CellLytic B 10x para cada 5 mL de amostra de célula. Posteriormente, foram adicionados benzonase e coquetel de inibidores de proteases. A suspensão foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação de 200 rpm para a total extração das proteínas das células. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 16.000g por 10 minutos para que o material insolúvel fosse para o precipitado. O sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi submetido à purificação por Cromatografia de Fase Reversa em sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

### **3.11. Obtenção da proteína expressa por Cromatografia de Fase Reversa em sistema HPLC**

Para o isolamento da proteína superexpressa, produto da extração descrita anteriormente (item 3.10), foi empregado a Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C18 em sistema HPLC. Para o processo cromatográfico, 500 µL de amostra induzida e não induzida com IPTG, foi aplicado e o fracionamento acompanhado por leituras de absorvância a 220 nm em um detector de arranjo de iodos (Diodo array entre 200 a 300 nm). Os eluentes empregados foram: Solução A (2% de Acetonitrila – ACN, 0,1% de Ácido Trifluoracético – TFA) e Solução B (ACN 80%, TFA 0,1%). O gradiente de eluição foi de 0 a 100% de solução B em 50 minutos e o fluxo foi de 0,7

ml/ minutos. Os espectros de absorção dos picos foram acompanhados e o pico majoritário foi coletado.

### **3.12. Isolamento de Ric c 3 mutante recombinante (mrRic c 3) por Cromatografia de Fase Reversa em Sistema HPLC**

A amostra contendo picos majoritários obtidos anteriormente por Cromatografia de Fase Reversa em sistema HPLC foram liofilizados e, posteriormente, submetidos a clivagem Enzimática com Endoproteinase Enteroquinase (EK) a fim de separar a cauda de histidina presente na proteína recombinante. Para isso, as amostras liofilizadas foram ressuspendidas em Tampão de Clivagem (5 mM de Tris-HCl pH 8,0, 22,2 mM de NaCl, Twen 20 a 0,1% e 1 mM de CaCl<sub>2</sub>) e, posteriormente, foi adicionado 0,02 u/μL da EK. Estas amostras foram incubadas a 23 °C por 16 h sob leve agitação. Após hidrólise, 500 μL desse material foi submetido à Cromatografia de Fase Reversa em sistema HPLC sob as mesmas condições descritas acima (item 3.11). Foi feito o acompanhamento dos espectros de absorção e, o pico correspondente ao padrão de albuminas 2S de mamona, contendo mrRic c 3, foi coletado.

### **3.13. Avaliação da alergenicidade de mrRic c 3**

Para avaliar o potencial alergênico da isoforma de albuminas 2S de mamona mutante recombinante (mrRic c 3), foi realizado ensaio “*in vitro*” de desgranulação de mastócitos de ratos.

#### **3.13.1. Obtenção de mastócitos**

Mastócitos de Ratos Wistar Fêmea foram obtidos no Biotério da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, sob aprovação do Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA – UENF), protocolo nº 297.

3 fêmeas de aproximadamente 250 g foram sacrificadas por asfixia em CO<sub>2</sub> (Dióxido de Carbono) e a cavidade peritoneal lavada com 20 mL de Meio DMEM

(*Dulbecco Modification of Minimum Essential Media*) gelado contendo 12 u/ mL de Heparina. O lavado retirado do peritônio do animal (cerca de 15 mL), foi colocado em placa de Petri e incubado por 30 minutos a 37 °C para separar os mastócitos dos macrófagos. Após este período, 2/3 do sobrenadante foi retirado cuidadosamente e descartado. O volume restante, do meio enriquecido com mastócitos, foi dividido em alíquotas de 100 µL.

### **3.13.2. Ensaio de Desgranulação de Mastócitos**

Alíquotas de 100 µL do meio enriquecido com mastócitos foram incubadas com 2 µL de soro total anti-albumina 2S de mamona e 10 µL de mrRic c 3 (teste) na concentração final de 10 µg/ mL, durante 1 h a 37 °C. Para o controle positivo, as células foram incubadas com 2 µL de soro total anti-albumina 2S de mamona e 10 µL do pool de Albuminas 2S (Ric c 1 e Ric c 3) e para o controle negativo, a incubação do meio foi apenas contendo 2 µL de soro.

Após o período de incubação, foi feita a contagem diferencial dos mastócitos por microscopia ótica.

### **3.13.3. Avaliação do percentual de desgranulação por microscopia ótica**

A contagem diferencial entre células íntegras e desgranuladas foi realizada em câmara de Neubauer, nos quatro quadrantes, através da observação em microscópio óptico Zeiss Axioplan. À suspensão de células incubadas (controle positivo, negativo e teste) foram adicionados 10 µL de solução aquosa contendo azul de toluidina 0,1%, formaldeído 10% e ácido acético 1%, pH 2,8, para evidenciar a observação dos grânulos celulares.

### **3.14. Avaliação efeito de mrRic c 3 sobre desenvolvimento larval**

Para avaliar a manutenção do efeito biológico contra  $\alpha$ -amilase em mrRic c 3 produzida, foi realizado ensaio “*in vivo*” com larvas de *Callosobruchus maculatus* crescidas em sementes artificiais. Este ensaio foi realizado em colaboração com a

Dr<sup>a</sup>. Antonia Elenir Amâncio Oliveira, no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) - UENF.

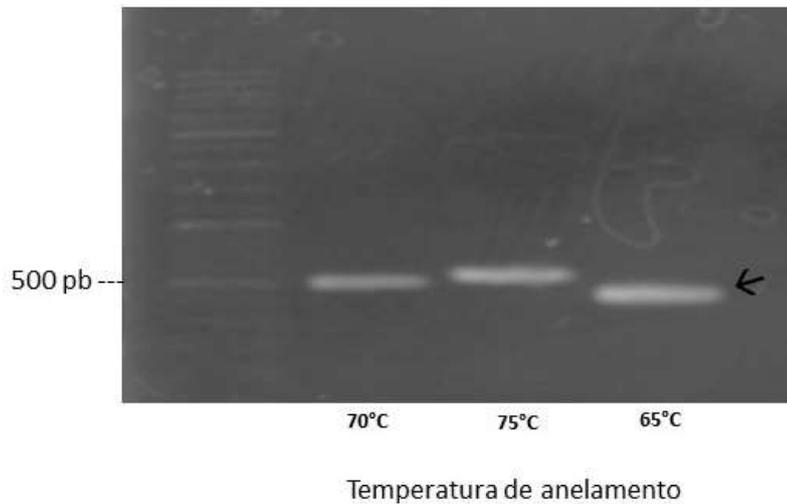
As sementes artificiais (massa total de 400 mg) foram preparadas conforme descrito por Nascimento (2009), contendo farinha de *Vigna unguiculatae* 2 % de mRicc 3. As sementes foram infestadas com fêmeas do inseto *C. maculatus* (2 dias de idade) e incubadas por 24 h a 28 °C. Após este período, as sementes foram desinfestadas, o excesso de ovos postos removidos com o auxílio de uma agulha fina, deixando apenas 3 ovos por semente. As sementes contendo os ovos foram novamente incubadas a 28 °C por 20 dias. Passado o tempo de incubação, as sementes foram abertas, as larvas retiradas, contadas e pesadas. Sementes controle foram preparadas com farinha de *Vigna unguiculata* isentas de mRicc 3 e seguiram as mesmas condições descritas para as sementes tratadas.

## **4. Resultados**

### **4.1. Avaliação da clonagem em vetor de expressão pET-32 EK/LIC (produto da PCR)**

A partir da região codificante de Ric c 3 contendo mutações (mRicc 3-pMA) foi realizada a clonagem em vetor de expressão pET-32 Ek/LIC. Primeiramente, foi realizada uma PCR em gradiente de temperatura a fim de identificar a melhor condição de amplificação (Figura 6).

Para a PCR foram utilizados os iniciadores “*pET Ric c 3 mut*” e “*Azul pET AS*” e, a reação obedeceu as condições informadas anteriormente (item 3.6).



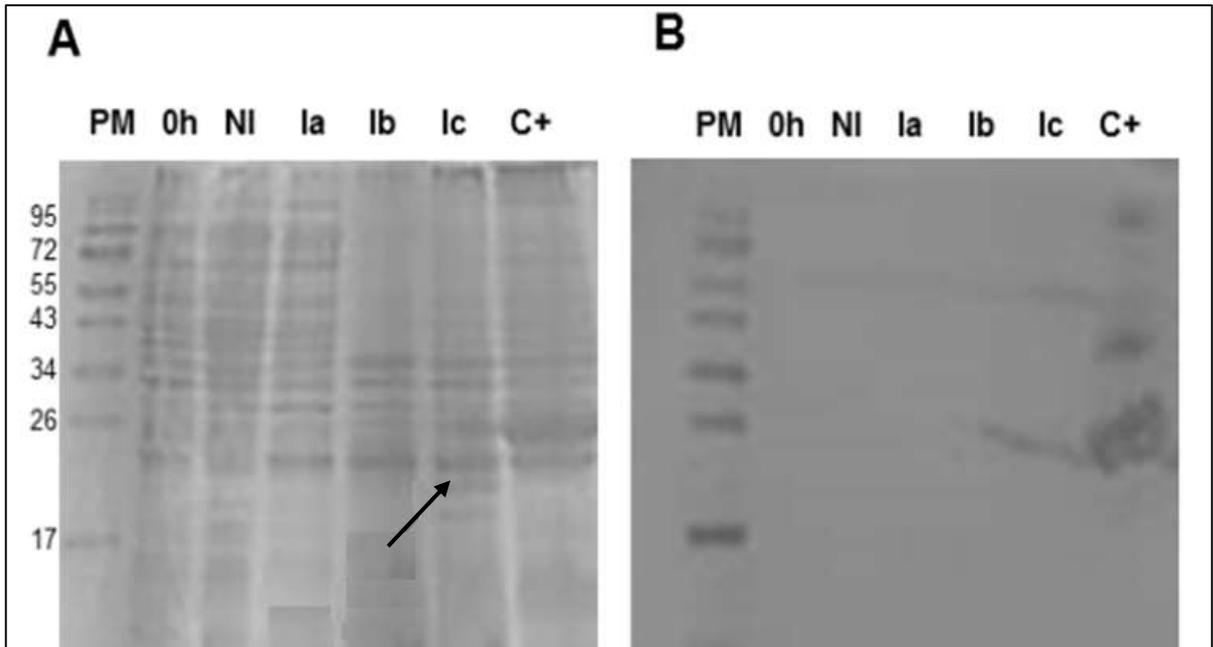
**Figura 6:** Gel de agarose 1% corado com GelRed™ (proporção de 1:4) demonstrando o resultado de PCRs realizadas em diferentes condições de temperatura. As temperaturas de anelamento encontram-se identificadas.

Observa-se que em todas as condições ocorreram amplificação, porém a banda aparente em 65°C está ligeiramente abaixo do marcador de 500 pb, altura esperada do fragmento. Posteriormente, o produto amplificado foi tratado com a T<sub>4</sub> DNA polimerase para ocorrer o anelamento do produto da PCR no vetor de expressão pET-32 EK-LIC.

#### 4.2. Avaliação da indução da superexpressão de mrRic c 3

A construção mRic c 3-pET foi utilizada para transformar *E. coli* linhagem Rosetta-gami<sub>2</sub> (DE<sub>3</sub>) pLysS. Após o processo de transformação bacteriana, foi então realizada a indução da expressão da Ric c 3 mutante adicionando 1 mM de IPTG.

Através da análise eletroforética em Gel de Poliacrilamida 15%, foi possível observar que as células de *E. coli* - Rosetta-gami submetidas a indução (I) expressaram um perfil proteico com banda de aproximadamente 26 kDa, não visualizada nas células que não foram induzidas (NI) (Figura 7 A). A confirmação de que a proteína superexpressa é de fato mrRic c 3, foi por *Western Blotting* utilizando anticorpo primário anti-albumina 2S gerado em coelho (Figura 7 B).

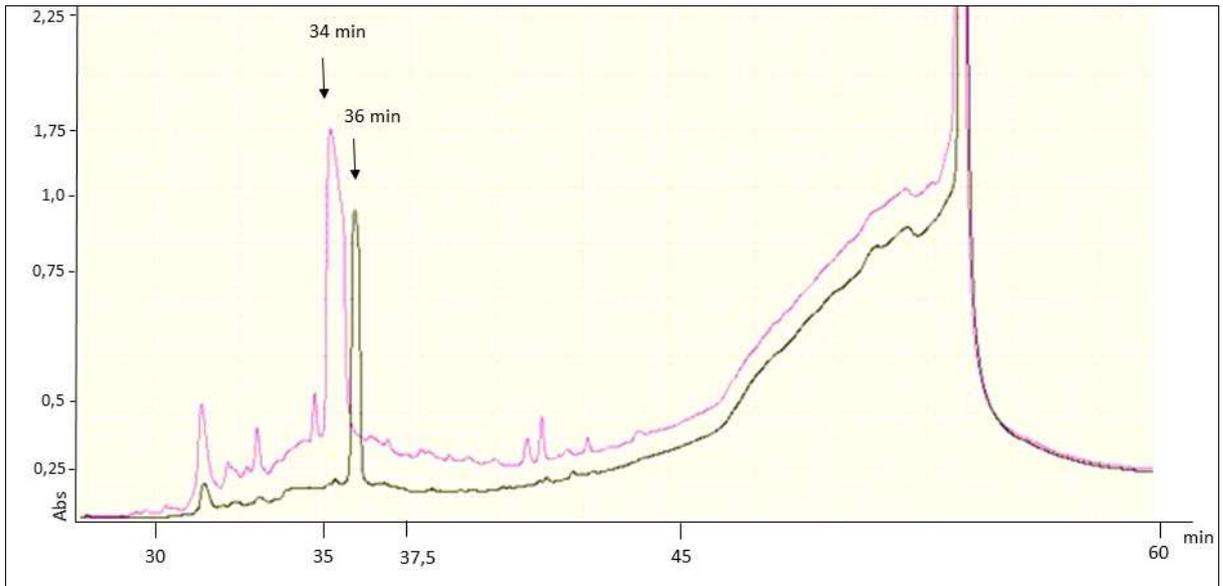


**Figura 7:** Análise da superexpressão de mrRic c 3 por (A) SDS-PAGE 15% da indução da expressão da proteína mutante recombinante (mrRic c 3) com IPTG e (B) *Western Blotting* tendo como espelho o SDS-PAGE da Indução. Ia, Ib e Ic: culturas induzidas com IPTG. NI: cultura não induzida. 0h: cultura no tempo 0 de indução. PM: padrão de peso molecular. C+: controle positivo (rRic c 1). A seta indica a banda de interesse.

#### 4.3. Purificação de mrRic c 3 por Cromatografia de Fase Reversa (HPLC)

A purificação da fração recombinante foi realizada por Cromatografia de Fase Reversa em coluna C18 em sistema HPLC como desenvolvido no item 3.11.

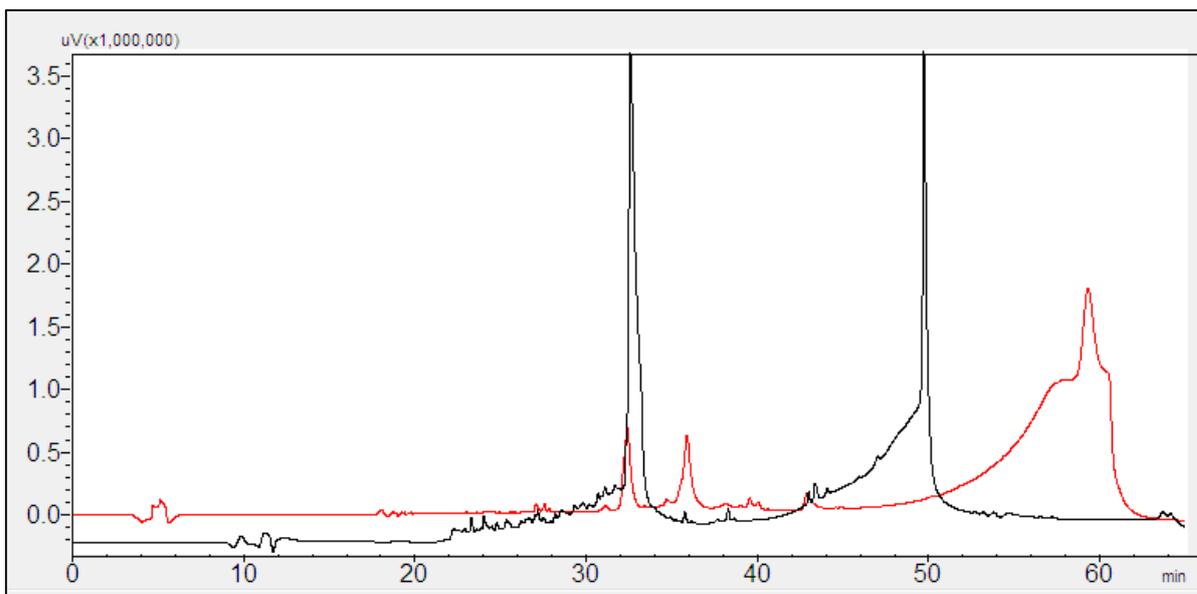
O perfil de eluição dos extratos induzidos e não induzidos sobrepostos é apresentado na figura 8. Em preto, observamos o cromatograma para o extrato não induzido. Há um pico “*Sharp*”, majoritário em 36 minutos. Para o extrato induzido observamos um pico majoritário com um ombro, eluído em 34 minutos (traçado rosa).



**Figura 8:** Cromatograma de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC – Sobreposição dos cromatogramas obtidos para o extrato bacteriano não induzido (traçado preto) e induzido (traçado rosa) com IPTG.

A fração recombinante majoritária, pico com tempo de retenção de 34 minutos, foi coletada e submetida à clivagem com EK para a liberação da cauda de histidina, como descrito no item 3.12.

O perfil cromatográfico empregando o pool de albumina 2S contendo Ric c 1 e Ric c 3 isoladas de sementes, é apresentado na Figura 9, traçado vermelho. Em preto é mostrado o perfil de eluição da proteína recombinante mutante (mrRic c 3), após a liberação da cauda de histidina, no qual observa-se que o tempo de retenção é similar ao tempo de Ric c 3 nativa.



**Figura 9:** Sobreposição dos cromatogramas de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC. Traçado vermelho: Pool de albumina 2S (Ric c 1 + Ric c 3); Traçado preto: Fração mutante recombinante após clivagem com EK (sem cauda de Histidina).

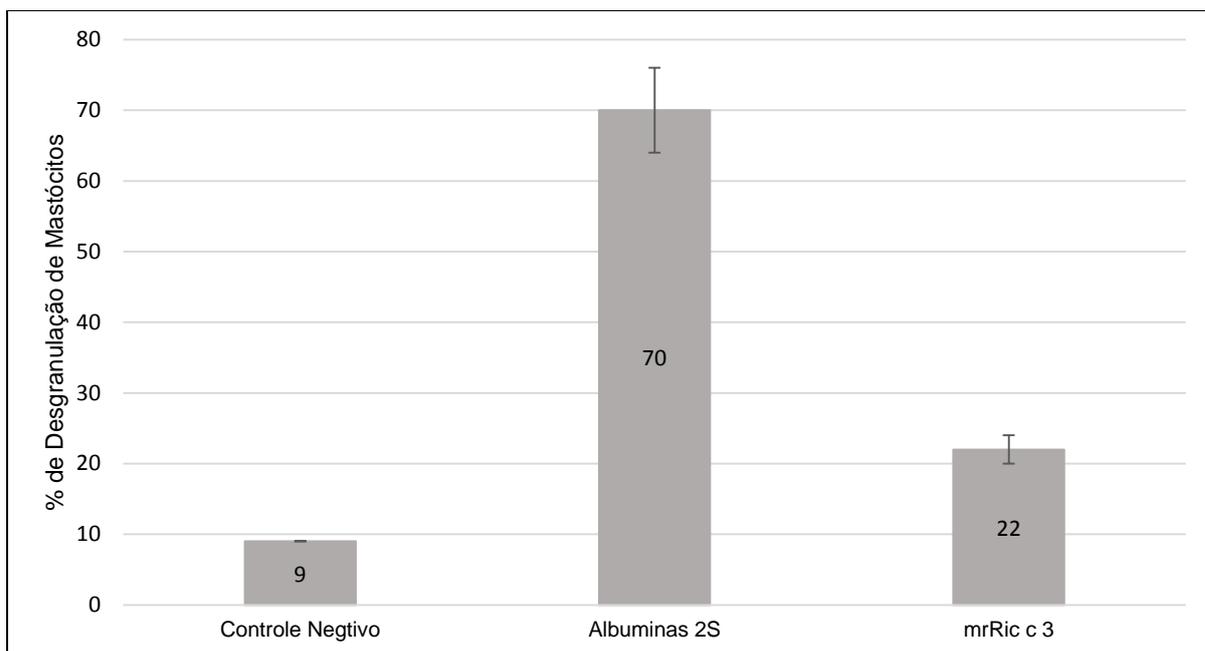
A amostra eluída (mrRic c 3) foi coletada para realização da avaliação da atividade biológica.

#### 4.4. Avaliação da Atividade Biológica de mrRic c 3

Para verificarmos se mrRic c 3 mantinha atividade biológica, foram realizados testes alérgicos e de inibição de  $\alpha$ -amilase.

##### 4.4.1. Análise da atividade alérgica

Inicialmente foi observada a diminuição na capacidade de desgranulação de mastócitos, como proposto pelas mutações realizadas na sequência gênica. A porcentagem de desgranulação de mastócitos de ratos foi observada como descrita no item 3.13.2. Por meio deste ensaio, pode-se observar que o controle negativo, contendo somente as células na presença do soro, desencadeou 9% de desgranulação celular. Ao contrário, 70% de desgranulação foi observada no controle positivo, onde as células foram incubadas na presença de soro anti-albumina 2S e do pool de albuminas 2S (Ric c 1 + Ric c 3). Para a amostra mrRic c 3 produzida, observamos apenas 22% de desgranulação celular (Figura 10).

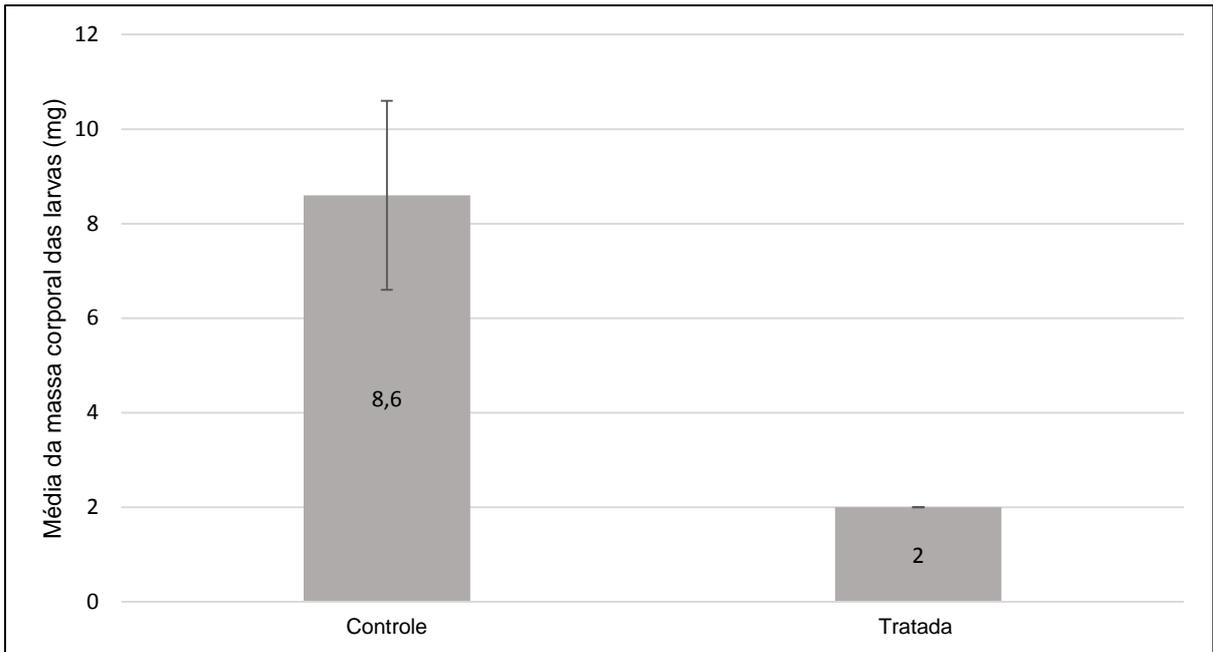


**Figura 10:** Ensaio de desgranulação de mastócitos. Controle negativo (mastócitos incubados apenas com soro anti-albumina 2S); Albuminas 2S/ controle positivo (mastócitos + soro anti-albumina 2S + Pool de Albuminas 2S - Ric c 1 e Ric c 3); mrRic c 3 (mastócitos + soro anti-albumina 2S + Ric c 3 mutante recombinante).

#### 4.4.2. Análise do efeito sobre o desenvolvimento larval

Ensaio *“in vivo”*, utilizando sementes artificiais contendo a proteína 2% de mrRic c 3, foram realizados para avaliar o potencial da proteína recombinante sobre o desenvolvimento das larvas *Callosobruchus maculatus*.

Na figura 11 pode-se observar o resultado obtido das massas das larvas dos insetos *C. maculatus* crescidas em sementes contendo a proteína mutada recombinante. Larvas que cresceram em sementes controle, contendo apenas farinha de *Vigna unguiculata*, apresentaram 8,6 mg de massa corporal média. Com relação a massa média das larvas crescidas na presença de mrRic c 3, obtivemos um resultado de 2 mg.



**Figura 11:** Média da massa corporal das larvas do inseto *C. maculatus*, alimentadas com sementes artificiais. Controle: sementes preparadas apenas com farinha de *V. unguiculata*; Tratada: sementes preparadas com farinha de *V. unguiculata* e 2% de mrRic c 3.

A figura 12 compara a diferença de tamanho entre as larvas alimentadas com a semente controle e a semente tratada (contendo mrRic c 3 em sua composição). Pode-se observar que a larva crescida na semente controle apresentou um tamanho significativamente maior que as larvas crescidas na semente tratada. Outro dado importante a ser destacado, é que na semente tratada, as larvas morreram, sendo contada apenas duas larvas (dados não mostrados).



**Figura 12:** Comparação entre larvas do inseto *C. maculatus* submetidas à alimentação com sementes artificiais contendo mrRic c 3 (à direita) e crescidas em sementes controle – livres de mrRic c 3 (à esquerda). É possível observar a diferença no desenvolvimento das duas larvas.

## 5. Discussão

Baseado nos estudos obtidos sobre os epitopos alergênicos das isoformas de albuminas 2S (Ric c 1 e Ric c 3) de mamona (FELIX et al., 2008) e quais resíduos de aminoácidos estão envolvidos no processo de desencadeamento da alergia (DEUS-DE-OLIVEIRA et al., 2011), caminhos para novas pesquisas foram abertos. Assim, esta pesquisa deu prosseguimento aos estudos envolvendo os principais alérgenos encontrados na mamona (*Ricinus communis*).

Com base na pesquisa de Deus-de-Oliveira et al. (2011), de que resíduos de aminoácidos ácidos, especificamente ácidos glutâmicos, estão diretamente envolvidos na interação do epítipo alergênico e a IgE, Nascimento et al. (2011) propôs, através de estudo “*in silico*” de modelagem molecular por homologia, mutações teóricas, substituindo os resíduos de ácidos glutâmicos por resíduos de aminoácidos que não fariam interação com a IgE e, conseqüentemente, não desencadearia o processo alérgico, obtendo resultados positivos.

A proposta de mutação do estudo de Nascimento et al., (2011) foi substituir os resíduos de ácido glutâmicos por resíduos de leucinas, por esse apresentar volume molecular similar e, por não possuir o grupamento carboxílico, impedindo a ligação à IgE. O foco deste trabalho então, foi produzir uma mutante recombinante, derivada de Ric c 3, uma das isoformas alergênica majoritária, presentes nas sementes e no pólen da planta *Ricinus communis* (mamoneira) a fim de validar ou não os estudos “*in silico*” propostos por Nascimento.

Visando realizar modificações na estrutura da proteína que minimizem sua atividade alergênica, inicialmente foi desenhada a região gênica codificante de Ric c 3 contendo mutações nos 4 epitopos ligantes de IgE, previamente descritos por Felix (2007), trocando ao todo, oito resíduos específicos de ácidos glutâmicos (E) por resíduos de leucina (L) (Figura 3).

Sabe-se que as isoformas de albuminas 2S de *R. communis* (Ric c 1 e Ric c 3) apresentam ação inibitória contra de  $\alpha$ -amilase (Nascimento et al., 2011) e, um ponto importante no desenho região gênica codificante de Ric c 3 contendo mutações, foi o de manter preservados os resíduos de ácidos glutâmicos envolvidos no sítio de interação com a  $\alpha$ -amilase. A alteração desses aminoácidos poderia resultar na perda da atividade de defesa da proteína, ou seja, a atividade inibitória

contra  $\alpha$ -amilase. Sendo assim, o desenho da região gênica preservou esses aminoácidos.

Após a obtenção da construção mutante (construção mRic c 3-pMA) em *E. coli* linhagem XL-10, realizou-se a clonagem em vetor de expressão pET-32 Ek/LIC. Assim, o vetor pET-32 EK/LIC foi escolhido por inserir a proteína recombinante a tioredoxina (Trx), que auxilia na solubilidade e contribuiu para a formação de pontes dissulfeto nas proteínas.

Sabe-se que a produção de proteínas recombinantes em bactérias às vezes é dificultada devido à insolubilidade e pela não formação de pontes dissulfeto na proteína recém sintetizada. Estes tipos de problemas geralmente fazem com que a proteína recombinante não apresente a atividade biológica da proteína naturalmente expressa (GRÄSLUND et al., 2008). Para a síntese de Ric c 3 mutante, estas alterações, fornecidas pelo uso do vetor de expressão pET-32 Ek/LIC, se mostraram eficientes na produção da proteína recombinante, como pode ser observado na figura 6.

A amostra referente à mrRic c 3, ainda contendo a cauda de histidina, foi aplicada à coluna. O tempo de retenção (TR) foi observado e quando comparado à Ric c 3 (natural) o mesmo se apresentou tardio. Esse perfil para o tempo já era esperado, pois a presença das caudas de tioredoxina e histidina inseridas à mrRic c 3 pelo vetor, muda a hidrofobicidade da proteína heteróloga. Os mesmos dados também foram observados por Pacheco-Soares et al., (2018), durante a produção da proteína Ric c 1 mutante recombinante.

A mrRic c 3 obtida após hidrólise da cauda de histidina com Endoproteínase Enteroquinase (EK), foi também purificada, de forma eficiente, por cromatografia de Fase Reversa em coluna C18 em sistema HPLC. Os resultados obtidos demonstram TR igual ao de Ric c 3 natural, como pode ser observado na figura 9.

É importante destacar que em sua forma natural, na planta, as isoformas alergênicas das albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são formadas por duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes de enxofre. Estas isoformas são produzidas a partir de um único precursor que sofre processamento pós-traducional por endopeptidases e carboxipeptidases, liberando as duas isoformas, Ric c 1 e Ric c 3, ambas constituídas de duas cadeias polipeptídicas (IRWIN et al., 1990). No entanto, este processamento poderia não ocorrerem um sistema bacteriano de produção de

proteínas recombinantes. Nossa abordagem de produzir Ric c 3 mutante recombinante como uma única cadeia polipeptídica foi também adotada por Pantoja-Uceda et al. (2003) que produziu Ric c 3 recombinante para estudos estruturais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Pantoja-Uceda et al. (2003) elucidou a estrutura tridimensional de Ric c 3, mas não avaliou propriedades biológicas.

As propriedades biológicas de mrRic c 3 obtida por meio deste trabalho, foi avaliada quanto a sua atividade alergênica e também quanto sua ação inibitória de  $\alpha$ -amilases. Quando mrRic c 3 foi testada em ensaios de desgranulação de mastócitos, observamos que ocorreu apenas 22% de desgranulação celular contra 70% de desgranulação no controle positivo, onde as células foram incubadas na presença de soro anti-albumina 2S e do pool de albuminas 2S (Ric c 1 + Ric c 3) (Figura 10), confirmando assim o estudo “*in silico*”, realizado por Nascimento (2009).

Estudo semelhante feito com alérgenos de *Brassica rapa* (GARMATIUK et al., 2013), demonstraram que mutações em resíduos de ácidos aspárticos reduziram a ligação cruzada do alérgeno mutante com a IgE, presente na membrana dos mastócitos sensibilizados, diminuindo assim o seu potencial alergênico.

Para analisar a preservação da atividade de defesa e verificar a eficácia da proteína mutante recombinante sobre o crescimento de larvas do inseto *C. maculatus*, foram preparadas sementes artificiais com farinha de *Vigna unguiculata* contendo 2 % de mrRic c 3. O tamanho e o peso das larvas crescidas em sementes contendo mrRic c 3 foram menores do que os das larvas crescidas em sementes controle (Figuras 11 e 12). Comportamento similar foi verificado por Nascimento (2009) através de sementes artificiais contendo o pool de albumina 2S.

Através desses ensaios, foi possível verificar que as mutações nos epitopos alergênicos da isoforma Ric c 3 e sua produção em sistema bacteriano a partir de um gene sintético, apresentou atividades hipoalergênicas e preservação da inibição de  $\alpha$ -amilase como esperadas.

Em síntese, acreditamos que este trabalho apresentou uma opção para estudos com outros alérgenos, e que a obtenção de uma proteína mutante recombinante hipoalergênica abre caminhos para novas abordagens terapêuticas de imunização para indivíduos que sofrem de diferentes alergias.

## 6. Conclusão

Ao realizar este trabalho concluímos que:

- Foi possível clonar e superexpressar Ric c 3 mutante recombinante (mrRic c 3), em sistema de expressão bacteriano;
- Testes de desgranulação de mastócitos demonstraram que, mrRic c 3 tem potencial alergênico reduzido, podendo ser caracterizada como uma proteína hipoalergênica;
- A incorporação de mrRic c 3 a sementes artificiais na concentração de 2 % reduziu drasticamente o crescimento das larvas do inseto *C. maculatus*

## 7. Referências

- AALBERSE, R. C. Structural biology of allergens. **Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology**, v. 106, n. 2, 2000.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular - 8ª edição**. 2015.
- AGIZZIO, A. P. et al. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 416, n. 2, p. 188–95, 15 ago. 2003.
- AKDIS, C. A. Allergy and hypersensitivity. Mechanisms of allergic disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 718–726, 2006.
- AZAM, M. M.; WARIS, A.; NAHAR, N. M. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. **Biomass and Bioenergy**, v. 29, p. 293–302, 2005.
- AZEVEDO; BELTRÃO. O agronegócio da mamona no Brasil. **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007.
- BELTRÃO ET AL. Opções para a Produção de Biodiesel no Semiárido Brasileiro em Regime de Sequeiro: Por Que Algodão e Mamona. **Embrapa Algodão**, 2009.
- BREITENEDER, H.; CLARE MILLS, E. N. Plant food allergens--structural and functional aspects of allergenicity. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 6, p. 395–9, set. 2005.
- BREITENEDER, H.; RADAUER, C. A classification of plant food allergens. **Journal Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, p. 821–30, 2004.
- BUFE, A. Significance of IgE-binding epitopes in allergic disease. **Journal Allergy clin immunol**, v. 107, n. 2, p. 19-21, 2001.
- CANONICA, G. W. et al. **WAO White Book on Allergy: Update 2013**. A World Federation of Allergy, Ashma & Clinical Immunology Societies. 2013.
- 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. 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.
- EL-AGAMY, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 64–72, 2007.
- FELIX, S. P. Caracterização de epitopos ligantes de IgE em alérgenos de *Ricinus communis* e investigação de respostas cruzadas entre alérgenos. **Monografia** -

Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

FELIX, S. P. Identificação de epitopos alergênicos de albumina 2S de *Ricinus communis* utilizando como modelos roedores e pacientes atópicos: reações cruzadas com alérgenos alimentares e inalantes e bloqueio através da ocupação dos sítios de reconhecimento. **Dissertação de Mestrado** - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

FELIX, S. P. MAYERHOFFER, R. O.; DAMATTA, R. A.; VERICIMO, M. A. NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O. L. T. Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. **Peptides**, v. 29, n. 4, p. 497–504, 2008.

FRANCO, Â. L. et al. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases Structure, function and potential for crop protection. v. 412, 2002.

GARMATIUK, T. et al. Characterization of mutants of a highly cross-reactive calcium-binding protein from Brassica pollen for allergen-specific immunotherapy. **Immunobiology**, v. 218, n. 218, p. 1155–1165, 2013.

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**, v. 1341, n. 2, p. 157–64, 5 set. 1997.

GERALDINI, M. et al. Alérgenos recombinantes na prática da imunoterapia \* Recombinant allergens in immunotherapy practice. p. 92–97, 2008.

GRÄSLUND, S.; ET AL. Protein production and purification. **Nat Methods**, v. 5, n. 2, p. 135–146, 2008.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218–230, 15 mar. 2008.

IRWIN, S. D. et al. The *Ricinus communis* 2S albumin precursor: a single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 222, n. 2–3, p. 400–8, jul. 1990.

IVANCIUC, O. et al. The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. **Molecular immunology**, v. 46, n. 5, p. 873–83, fev. 2009.

JUTEL, M.; AKDIS, C. A. Novel immunotherapy vaccine development. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 14, n. 6, p. 557–563, 2014.

KREIS, M. et al. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. **Journal of Molecular Biology**, v. 183, n. 3, p. 499–502, 1985.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, 1970.

LEUNG, D. Y. M. et al. Atopic dermatitis. **Lancet (London, England)**, v. 361, n. 9352, p. 151–60, 11 jan. 2003.

LINHART, B.; VALENTA, R. Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4328–4335, 2012.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. A CROSS-TALK BETWEEN PLANTS AND INSECTS Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **J. Plant Physiol**, v. 14, n. 2, p. 71–81, 2002.

NASCIMENTO, V. V. Ricinus communis L . como inibidores de  $\alpha$  -amilase e relação estrutura-atividade de suas principais isoformas , Ric c 1 e Ric c 3. **Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia)** - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. 2009.

NASCIMENTO, V. V. et al. In silico structural characteristics and  $\alpha$ -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.

OZDEMIR, C. et al. Mechanisms of Aeroallergen Immunotherapy: Subcutaneous Immunotherapy and Sublingual Immunotherapy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, n. 1, 2016.

PACHECO-SOARES, T.; CARVALHO, A. O.; ARAÚJO, J. C.; DE SOUZA, G. S.; MACHADO, O. L. T. A modified, hypoallergenic variant of the Ricinus comunis Ric c 1 protein retains biological activity. **Bioscience Reports**. 2018.

PANTOJA-UCEDA, D. et al. Solution Structure of RicC3 , a 2S Albumin Storage Protein from. p. 13839–13847, 2003.

PAULI, G. et al. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 5, p. 951–960, 2008.

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1696, n. 2, p. 171–180, 12 fev. 2004.

RAJAN, T. V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: A re-interpretation. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 7, p. 376–379, 2003.

SCHOLZ, V.; DA SILVA, J. N. Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 2, p. 95–100, fev. 2008.

SEVERINO, L. S. O Que Sabemos sobre a Torta de Mamona. **Documentos 134 - Embrapa**, p. 1–32, 2005.

SHEWRY, P. R. et al. Plant protein families and their relationships to food allergy. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 906–910, 2002.

SILVA, C. P. et al. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on  $\alpha$ -amylases and oligosaccharidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 355–366, 1999.

STEFAN, S. et al. Conjugation of wildtype and hypoallergenic mugwort allergen Art v 1 to flagellin induces IL-10-DC and suppresses allergen-specific TH2-responses in vivo. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

SVENSSON, B.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P. K.; BONSAGER, B. C. Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1696, n. 2, p. 145-156, 2004.

TOWBIN, H.; STAHELINT, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography). v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 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. 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.

VRTALA, S. et al. Antibodies Pollen Allergen, Bet v 1, Induce Blocking Recombinant Fragments of the Major Birch T Cell Epitope-Containing Hypoallergenic T Cell Epitope-Containing Hypoallergenic Recombinant Fragments of the Major Birch Pollen Allergen, Bet v 1, Induce Block. **J Immunol The Journal of Immunology by guest on**, v. 165, p. 6653–6659, 2000.

YOULE, R. J.; HUANG, A. H. Evidence that the castor bean allergens are the albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. **Plant physiology**, v. 61, n. 6, p. 1040–2, jun. 1978.

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.