



AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DE IgE COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO COMO  
ABORDAGEM ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS ALÉRGICAS

**DÉBORA MOTHÉ DE CAMPOS MESQUITA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
MARÇO - 2020

AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DE IgE COM ÁCIDO L-GLUTÂMICO COMO  
ABORDAGEM ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS ALÉRGICAS

**DÉBORA MOTHÉ DE CAMPOS MESQUITA**

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.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
MARÇO – 2020

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, sob a orientação da Professora Dra. Olga Lima Tavares Machado.

Financiamentos:

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

Dedico este trabalho

a todos que acreditaram que  
era possível iniciar mais  
esta etapa da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

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

A Deus, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida. Meu agradecimento e minha homenagem a Dr<sup>a</sup> Olga L. T. Machado. Mais que minha professora e orientadora na Graduação, no Mestrado e no Doutorado, agradeço por sua dedicação e responsabilidade na elaboração desta tese. No decorrer da minha formação, acabamos construindo uma amizade.

A revisora deste trabalho, Dr<sup>a</sup> Juliana Ywasaki Lima, pela atenção, dedicação e profissionalismo dispensados na revisão deste trabalho.

A todos que contribuíram experimentalmente em etapas fundamentais para a conclusão desta tese de doutorado: Dr<sup>a</sup> Giliane da Silva de Souza Cabral, sob supervisão da Dr<sup>a</sup>. Elena Lassunskaja do Laboratório de Biologia (LBR/UENF), aos responsáveis pelo biotério da UENF, Dr. Arthur Giraldo Guimarães (LBCT/UENF), Dr<sup>a</sup> Marinete Pinheiro Carrera (LMPA/UENF), Dr. Guillermo Docena, Dr<sup>a</sup> Paola L.

Smaldini do Laboratorio do Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP - Universidad Nacional de La Plata, UNLP, Argentina). Aos alunos: Rizzo Gaston, Julian Vaccaro, Albeiro Manuel representando toda equipe do "BOX V" (IIFP/UNLP, Argentina). Aos alunos de IC, Mestrado e Doutorado da UENF: Ana Flávia, Joaquim Barbosa e João Marcos. De forma coletiva, preciso registrar a contribuição das equipes de trabalho das quais participei, aos amigos dos laboratórios LQFPP, LBR, LMPA e a outros amigos da UENF.

Preciso homenagear, ainda, os amigos queridos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso. Aos companheiros de pesquisa do laboratório durante minha progressiva formação, Jucélia, Isabela, Grazielle, Thais, Francianne, Paula, Carol, Raquel, Mariana, Ana Flávia, Igor, Leonardo, Lara, Tatiana, Rebeca e Luciana por todo auxílio na execução de experimentos. Como resultado dessa parceria construímos nossa amizade. Agradeço também a minha Co-orientadora durante a Graduação: Dr<sup>a</sup> Natália Deus de Oliveira pela cumplicidade e responsabilidade direta na condução dessa pesquisa e por ter me ensinado tão brilhantemente sobre o projeto de Iniciação Científica que resolvi prosseguir e chegar até a conclusão da tese de doutorado. Aos meus familiares, meu pai José Henriques, minha mãe Lediméa, meus irmãos Guilherme, Hugo, Matheus e Wellington, meus sobrinhos Jeff, Kallebe e Pedro Lucas. Aos meus sogros Joelcy e Dalva, meus cunhados Valéria e Edmilson, Michel e Adriana

por todo apoio, zelo e compreensão nos momentos de tensão e que me exigiam dedicar horas de estudos e por vezes precisei me ausentar. Vocês são meu exemplo de vida. Obrigada por terem me ajudado em todos os momentos.

Finalmente, agradeço ao meu marido Renato por sua ajuda, compreensão, sabedoria, paciência e o incentivo nessa jornada. Dividir a vida com você é um prazer. Enfim, a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## **LISTA DE SIGLAS**

**AG** Ácido glutâmico

**AGN** N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico

**APCs** Células apresentadoras de antígenos

**APLV** Alergia a proteínas do leite de vaca  
**Ara h 2** Alérgeno 2 de *Arachis hypogea*  
**ASIT** Allergen-specific immunotherapy  
**Bet v 1** Alérgenos do pólen de bétula  
**CD4+** Grupamento de diferenciação 4 ou cluster of differentiation  
**CD40** Grupamento de diferenciação 40 ou cluster of differentiation  
**CH3** Domínio constante da cadeia pesada  
**DNA-LAMP** Lysosomal-associated membrane protein **FDA**  
Food and Drug Administration  
**F1** Fração 1  
**F2** Fração 2  
**F3** Fração 3  
**Ara h 6** Alérgeno 6 de *Arachis hypogea*  
**ELISA** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
**Fc** Fragmento cristalizável da IgE  
**FCεRI** Receptor de alta afinidade  
**GM-CSF** Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos  
**H1** Receptor de histamina H1  
**H2O2** Peróxido de hidrogênio  
**H2SO4** Ácido sulfúrico  
**IgA** Imunoglobulina A  
**IgE** Imunoglobulina E  
**IgG** Imunoglobulina G  
**IgG1** Imunoglobulina G subclasse 1  
**IgG4** Imunoglobulina G subclasse 4  
**IFN-γ** Interferon γ  
**Jat c 1** Alérgeno 1 de *Jatropha curcas*  
**Jug r 1** Alérgeno 1 de *Juglans regia*     **kDa**  
Kilodaton  
**IL-4** Interleucina 4  
**IL-10** Interleucina 10  
**IL-13** Interleucina 13  
**L-Glu** L- Ácido glutâmico  
**MHC II** Major Histocompatibility Complex **nsLTPs** Proteínas de  
transferência de lipídios não-específicas  
**OPD** O-Ortofenilediamina  
**P0** Peptídeo 0

**P1** Peptídeo 1  
**P2** Peptídeo 2  
**P3** Peptídeo 3  
**P4** Peptídeo 4  
**P5** Peptídeo 5  
**Phl p 1** alérgeno de *Phleum pratense*  
**PBS** Tampão fosfato salino  
**PLV** Proteínas do Leite de Vaca  
**Ric c 1** Alérgeno 1 de *Ricinus communis*  
**Ric c 3** Alérgeno 3 de *Ricinus communis*  
**Ses i 1** Alérgeno 1 de *Sesamun indicum*  
**Sin a 1** Alérgeno 1 de *Sinapis alba*  
**TC** Toxina de cólera  
**TFA** Ácido trifluoracético  
**TGF-β** Fator de crescimento transformador beta  
**TH1** Linfócitos T helper 2  
**TH2** Linfócitos T helper 2  
**TH17** Linfócitos T helper 17  
**WRK** Woodward's reagent K

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT .....	XV
1.Introdução .....	1
1.1 - Alérgenos Vegetais .....	5
1.2 – Mamona – oleaginosa de interesse econômico .....	9
1.3 - Componentes alergênicos .....	10
1.3.1 - Albumina 2S de mamona .....	11
1.3.2 - Estrutura das albuminas 2S .....	12
1.4- Aspectos imunológicos da alergia alimentar .....	15



1.4.1 – Alérgenos do leite de vaca .....	19
1.5 - Relevância clínica das reações cruzadas entre alérgenos .....	20
1.6 – Abordagens terapêuticas para o tratamento da alergia .....	21
1.6.1 – Anti-histamínicos .....	22
1.6.2 – Imunoterapia alérgeno-específica .....	23
1.6.3 – Terapias alérgeno não específicas .....	26
1.6.4 - Uso de anticorpos anti-IgE .....	26
1.6.5 – Uso de pequenos peptídeos .....	28
1.7 – Tratamento da alergia por bloqueio de IgE .....	28
1.8 – O ácido glutâmico e sua função neurológica .....	30
2.Objetivo Geral: .....	34
2.1.Objetivos específicos.....	34
3- Material e Métodos .....	35
3.1- Obtenção de albumina 2S e ricina das sementes de mamona.....	35
3.2- – Experimentação animal: .....	36
3.2.1- Protocolos de imunizações .....	37
3.3- - Detecção de imunoglobulinas séricas por ELISA .....	38
3.4- – Ensaio de desgranulação de mastócitos e reação cruzada .....	39
3.5.1 – Tratamento com os aminoácidos livres .....	41
3.5.2 - Avaliação in vivo de sinais clínicos da reação alérgica .....	43
3.5.3 - Teste cutâneo .....	43
3.6 – Avaliação comportamental .....	44
3.4.1- - Teste de potencialização do tempo de sono .....	44
3.4.2- - Teste de coordenação motora (Rota rod) .....	45
3.4.3- – Teste de movimentação espontânea (Campo aberto) .....	46
4. Resultados .....	48
4.1- Purificação de albuminas 2S de sementes: .....	48
4.2- – Detecção de imunoglobulinas nos soros policlonais .....	49
4.2 – Ensaio de reatividade cruzada e bloqueio com ácido glutâmico .....	51
4.3 – Respostas in vivo da administração oral de PLV e albumina 2S.....	53
4.5 – Respostas in vivo da administração de ácido L-glutâmico ... como bloqueador de IgE .....	56

4.6 - Teste de potencialização do tempo de sono .....	58
4.7 - Teste de coordenação motora (rota-rod) .....	59
4.8 – Avaliação da movimentação espontânea .....	60
5. Discussão.....	62
7- Referências Bibliográficas .....	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos da reação alérgica.. .....	3
Figura 2: Mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) e suas estruturas, folhas e frutos. ....	9
Figura 3: Evolução do estudo dos epitopos de IgE presentes nas albuminas 2S de mamona. 2013). ....	10
Figura 4: Esquema da ligação de uma proteína alergênica.....	17
Figura 5: Esquema da neurotransmissão glutamatérgica. ....	32
Figura 6: Caixa dormitório para manutenção dos animais. ....	37
Figura 7: Cronograma do protocolo experimental de imunização.. .....	38
Figura 8: Desenho esquemático do protocolo experimental em camundongos.....	42
Figura 9: Aparelho rota-rod para teste de locomoção.Fonte: arquivo pessoal.....	45
Figura 10: Arena utilizada no teste de movimentação espontânea. ....	47
Figura 11: Perfil cromatográfico da cromatografia líquida de exclusão molecular. ....	48
Figura 12: Perfil cromatográfico da albumina 2S (Ric c 3 e Ric c 1) de mamona após cromatografia de fase reversa em coluna C-18, sistema HPLC. ....	49
Figura 13: Detecção de imunoglobulinas no soro de camundongos.....	50
Figura 14: Ensaio imuno-enzimático de bloqueio da ligação de IgE aos alérgenos.....	52
Figura 15: Respostas <i>in vivo</i> do modelo animal para alergia alimentar a PLV e Albumina 2S. ....	53
Figura 16: Respostas <i>in vivo</i> do modelo animal para alergia alimentar.....	55
Figura 17: Respostas <i>in vivo</i> do modelo animal para alergia alimentar (Teste cutâneo) .....	57

Figura 18: Avaliação do efeito de potencialização do tempo de sono induzido por tiopental de sódio.. .....	58
Figura 19: Avaliação do tempo de permanência no aparelho Rota-Rod após tratamentos...59	
Figura 20: Avaliação da atividade locomotora dos camundongos após tratamentos. ....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela I: Alérgenos vegetais da classe das albuminas 2S com seus epitopos mapeados.....	8
Tabela II: Características estruturais dos peptídeos sintéticos derivados de isoformas de albuminas 2S de mamona .....	13
Tabela III:Resumo das estratégias para o tratamento de alergias .....	28
Tabela IV: : Relação dos compostos que serão utilizados nos ensaios de bloqueio .....	38
Tabela V: Porcentagem de degranulação desencadeada por reação cruzada entre albumina 2S de <i>Ricinus communis</i> L. e alérgenos alimentares ou aeroalérgenos.....	51

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Descrição dos sinais clínicos observados no modelo animal para alergia alimentar.....	42
---	----

## RESUMO

As doenças alérgicas mediadas por IgE aumentaram nas últimas décadas. A alergia alimentar ao leite constitui um grave problema de saúde. *Ricinus communis* L. é uma oleaginosa cujo óleo presente em suas sementes, possui diversas aplicações industriais. Alérgenos, pertencentes à classe das albuminas 2S, são encontrados nas sementes desta planta, as isoformas alergênicas identificadas são Ric c1 e Ric c3. Esses alérgenos reagem de forma cruzada com alérgenos de outras fontes como amendoim, camarão, peixe, milho, gramíneas, poeira doméstica e tabaco. Em geral, os tratamentos para alergia, consiste em terapia anti-IgE usando anticorpo monoclonal omalizumab (Xolair) e uso de fármacos antihistamínicos. No entanto, os anti-histamínicos aliviam apenas os sintomas e não tratam a causa da alergia. Além disso, quanto ao uso da terapia anti-IgE, o alto custo do omalizumab limita seu uso para tratamento contínuo. Neste trabalho, propomos uma abordagem imunoterapêutica alternativa, denominada “bloqueio de IgE” através de ácido L-glutâmico e o análogo N- (4-nitrobenzoil) - Ácido glutâmico. Iniciamos protocolos de imunização por via intraperitoneal em camundongos BALB/c para obter soro rico em IgE específica e também sensibilizamos por via oral com proteínas do leite de vaca (PLV) usando TC ou ricina como adjuvante para análise de bloqueio de IgE *in vivo*. Avaliamos a presença de IgE, IgG e IgG1 específica no soro dos animais imunizados com albmina 2S de mamona. Verificamos por ensaios ELISA que o ácido L-glutâmico (L-glu) foi capaz de reduzir respostas cruzadas com alérgenos de outras fontes alimentares e inalantes. Respostas *in vivo* do modelo animal alérgico para PLV, mostraram que a ricina pode ser usada como adjuvante. O tratamento com L-glu (30 mg/kg) foi capaz de reduzir os sinais clínicos nos animais alérgicos. Para propor o uso de L-glu como um medicamento, alguns testes farmacológicos foram realizados. Avaliamos o comportamento dos animais que receberam 10, 30 e 50 mg/kg deste aminoácido e do análogo N- (4-nitrobenzoil) L-Ácido glutâmico. No teste do sono, os grupos que receberam ácido L-glutâmico nas doses de 10 e 30 mg / kg tiveram um tempo de sono semelhante ao grupo controle (veículo). O grupo que recebeu ácido L-glutâmico na dose de 50 mg/kg teve o menor tempo de sono, isto é, ácido L-glutâmico 50 mg / kg reduziu significativamente o tempo de sono em comparação com o veículo. No teste rota-rod, não houve diferenças significativas entre os grupos de animais tratados com ácido L-glutâmico e os grupos controles, assim como no teste de locomoção no campo aberto. Os animais que receberam as doses de 30 mg/kg de L-glu, não apresentaram alterações comportamentais, sugerindo a possibilidade do uso terapêutico

deste aminoácido como um possível fármaco para tratar os sintomas desencadeados pelas reações alérgicas.

Palavras-chave: tratamento de alergias; albumina 2S, agentes bloqueadores de IgE.

## ABSTRACT

IgE-mediated allergic diseases have increased in recent decades. Food allergy to milk is a serious health problem. *Ricinus communis* L. is an oilseed whose oil present in its seeds has several industrial applications. Allergens, belonging to the 2S albumin class, are found in the seeds of this plant, as the identified allergenic isoforms are Ric c1 and Ric c3. These allergens cross-react with other sources such as peanuts, shrimp, fish, corn, grasses, household dust and tobacco. In general, allergy treatments consist of anti-IgE therapy using monoclonal antibody omalizumab (Xolair) and use of antihistamine drugs. However, antihistamines only relieve symptoms and do not address the cause of the allergy. In addition, regarding the use of anti-IgE therapy, or the high cost of omalizumab limits its use for continuous treatment. In this work, we propose an alternative immunotherapeutic approach, called "IgE block" through L-glutamic acid and N- (4-nitrobenzoyl) -glutamic acid. We initiated immunization protocols intraperitoneally in BALB / c mice to obtain serum rich in specific IgE and we also sensitized orally with cow's milk proteins (PLV) using CT or ricin as an adjuvant for analysis of IgE block in vivo. A specific IgE, IgG and IgG1 presence is available in the serum of animals immunized with castor 2S albumin. It was verified by ELISA assays that L-glutamic acid (L-glu) was able to reduce cross-responses with allergens from other food sources and inhalants. In vivo responses of the allergic animal model to PLV, showed that ricin can be used as an adjuvant. Treatment with L-glu (30 mg / kg) was able to reduce the clinical signs in allergic animals. In order to propose the use of L-glu as a medicine, some pharmacological tests were carried out. We evaluated the behavior of animals that received 10, 30 and 50 mg / kg of this amino acid and the N- (4-nitrobenzoyl) Lglutamic acid analogue. In the sleep test, groups that received L-glutamic acid at doses of 10 and 30 mg / kg had a sleep time similar to the control group (vehicle). The group that received L-glutamic acid at a dose of 50 mg / kg had the shortest sleep time, that is, Lglutamic acid 50 mg / kg significantly reduced the sleep time compared to the vehicle. In the rota-rod test, there were no significant differences between the L-glutamic acid groups and the control group of the (vehicle), as well as in the locomotion test in the open field. The animals that received doses of 30 mg / kg of L-glu, did not show behavioral changes, suggesting the possibility of the therapeutic use of this amino acid as a possible drug to treat the symptoms triggered by allergic reactions.

Keywords: allergy treatment; 2S albumin, IgE blocking agent

## 1. Introdução

As reações de hipersensibilidade mediada por imunoglobulina E (IgE), incluindo asma e rinite alérgica, dermatite atópica, alergia alimentar e anafilaxia continuam aumentando sua prevalência em diversas partes do mundo tornando-se um importante problema de saúde pública (Lucae *et al.*, 2016; Asrat *et al.*, 2020). Estima-se que as manifestações respiratórias são as mais predominantes, afetando até 30% da população em geral (Papadopoulos, 2012; Larsen, Broge e Jacobi, 2016). O aumento progressivo das doenças alérgicas pode estar relacionado não só à predisposição genética e as mudanças no estilo de vida, mas também a modificações ambientais como clima, umidade, poluição do ar ou outras condições ambientais que podem afetar na qualidade do ar com relação a dispersão de alérgenos presentes no pólen, levando ao aumento da exposição e sensibilização em indivíduos suscetíveis (Ziello *et al.*, 2012; Reinmuth-Selzle *et al.*, 2017).

A alergia alimentar constitui um grave problema de saúde humana acometendo até 6% das crianças e 3% a 4% dos adultos (Wang e Sampson, 2011; Kumar *et al.*, 2012). A prevalência de doenças alérgicas causadas por alimentos tem aumentado nos últimos anos, principalmente nos países ocidentais e tem sido um desafio o suporte necessário para diagnóstico e tratamento adequado, devido ao alto custo associado a estes (Tang e Mullins, 2017). Os sintomas da alergia são causados pela exposição a macromoléculas exógenas conhecidas como antígenos ou alérgenos (Lanser *et al.*, 2015).

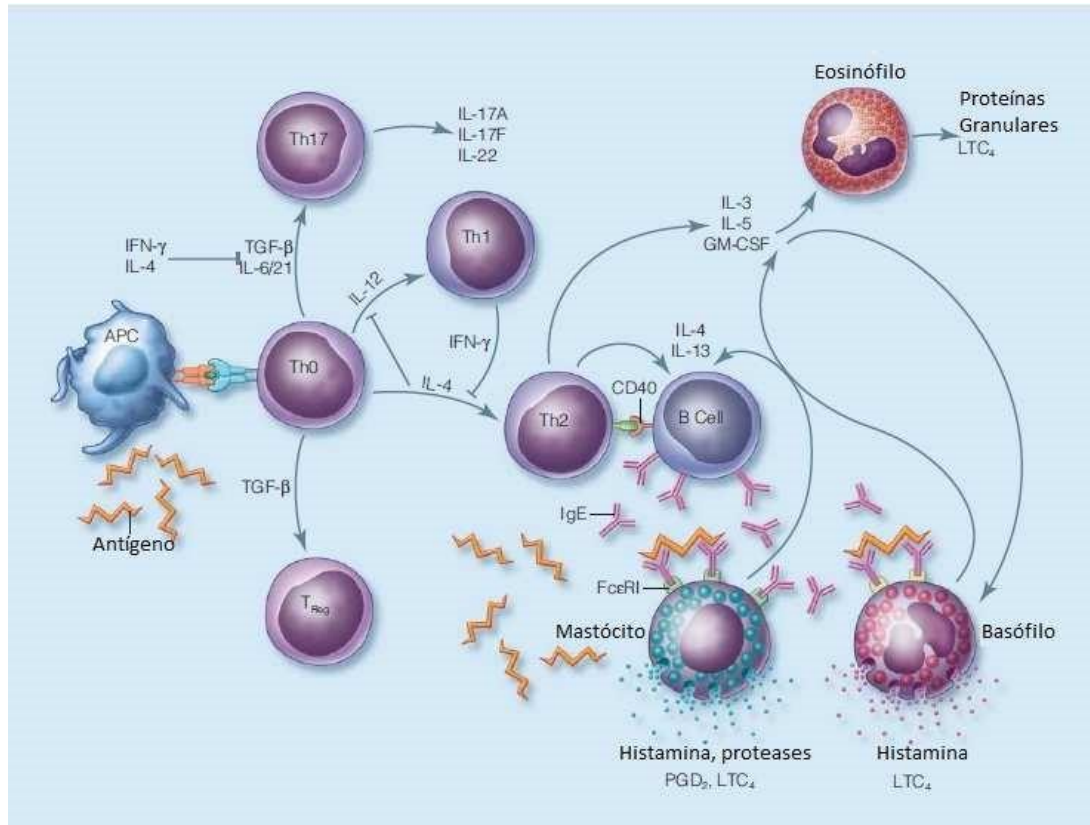
A reação de hipersensibilidade tem duas fases: sensibilização, quando o indivíduo é exposto pela primeira vez ao antígeno, e a reação subsequente, quando ocorre novamente uma exposição a este mesmo alérgeno (Lanser *et al.*, 2015). As reações alérgicas mediadas por IgE são as mais comuns. Inicialmente o alérgeno é internalizado pelas células apresentadoras de antígeno (em inglês, antigenpresenting cells [APCs]), incluindo macrófagos, células dendríticas e células B. Após sofrer endocitose, o alérgeno é submetido à clivagem proteolítica e os fragmentos peptídicos gerados são expostos na superfície da APC associada com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (em inglês, major histocompatibility complex [MHC]) II. (Ozdemir *et al.*, 2016) .

A indução das células T auxiliares pode ser influenciada por vários fatores, tais como o tipo e a quantidade de alérgenos, a duração e a via de exposição, bem como o tipo de citocina produzido durante a diferenciação linfocítica. A resposta alérgica via Th2 está associada com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13, que estimula o envolvimento da IgE e de eosinófilos. No entanto, apenas a IL-4, produzida em abundância por basófilos ativados, é capaz de induzir a diferenciação de células Th0 em células Th2, resultando em inflamações alérgicas mediadas pela IgE. (D'Amato, 2006a; Ozdemir *et al.*, 2016).

Os anticorpos IgE se ligam ao receptor específico de alta afinidade FcεRI expresso nos mastócitos, eosinófilos e basófilos. A ligação cruzada entre duas IgEs e o receptor FcεRI desencadeada pelos alérgenos, ativa uma série de reações intracelulares que levam à desgranulação dessas células e liberação de mediadores inflamatórios, incluindo a histamina, que induzem aos sintomas alérgicos (Wang *et al.*, 2016; Ward, Dana E. *et al.*, 2018).

A histamina desempenha um papel fundamental na resposta alérgica. A liberação de histamina faz com que os músculos lisos do trato gastrointestinal e respiratório se contraíam, estimula os nervos e dilata os vasos sanguíneos (Church e Church, 2013). Esses efeitos incluem, entre outras manifestações clínicas, eritema, rubor, congestão nasal, prurido, dor de cabeça, hipotensão, taquicardia e broncoconstrição, e as manifestações sistêmicas incluem choque anafilático e se uma doença alérgica não for diagnosticada e tratada adequadamente, ela tende a progredir para uma doença debilitante grave e crônica. (Iguchi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). A Figura 1 ilustra o mecanismo envolvido nas respostas alérgicas mediadas pela IgE





**Figura 1:** Mecanismos da resposta alérgica. O antígeno é absorvido pelas APCs e, após o seu processamento, é apresentado para as células Th CD4+ virgens. As APCs e as citocinas orientam a resposta da célula Th: (IL-12) a Th1, IL-4 a Th2, TGF-β, juntamente com a IL-6 em camundongos ou com a IL-21 em seres humanos para Th17, e TGF-β para as células T reguladoras. A produção de IFN-γ durante a resposta de Th1 suprime uma resposta de Th2, enquanto que a produção de IL-4 pelas células Th2 suprime uma resposta de Th1. A IL-4 e o IFN-γ suprimem a formação de células Th-17. As IL-3 e IL-4 também estimulam as células B a mudarem a produção de IgM ou IgG para a produção de IgE. A sinalização através da CD40 na célula B também é imprescindível para a mudança de classe da IgE. Outras citocinas de Th2, como a IL-3, IL4 e o GM-CSF, resultam na sobrevivência e na ativação de eosinófilos e basófilos. A IgE liga-se aos FcεRIs nos mastócitos e nos basófilos; o alérgeno é capaz de realizar uma ligação cruzada com as IgEs fixadas ao receptor específico, iniciando a liberação do mediador (adaptado de Schwartz *et al.*, 2015).

A compreensão dos mecanismos pelos quais o sistema imunológico induz e controla a resposta alérgica, depende do conhecimento da estrutura de vários alérgenos e da identificação de epitopos, que são importantes para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da alergia (Aalberse, 2011; Machado, Campos-Mesquita e Pacheco-Soares, 2017). Desde a identificação do papel crucial da molécula IgE nas reações alérgicas, o controle das respostas mediadas por este anticorpo tem sido um dos principais objetivos terapêuticos (Baumann *et al.*, 2010).

Dentre as estratégias para o tratamento da alergia mais utilizadas estão: farmacoterapia, imunoterapia e terapia anti-IgE (Blank, Charles e Benhamou, 2016; Ozdemir *et al.*, 2016). Devido ao papel central da histamina nas respostas alérgicas, muitas dessas reações são tratadas com anti-histamínicos, incluindo rinite alérgica e urticária, porém esses medicamentos visam apenas aliviar os sintomas. O seu mecanismo de ação consiste basicamente em ligar-se aos receptores de histamina para inibir seus efeitos, porém é eficaz apenas para aliviar os sintomas (Church e Church, 2011; Wang *et al.*, 2016).

Considerando o cenário atual, faz-se necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para distúrbios alérgicos, terapias eficazes e seguras que previnam o surgimento dessas reações, melhorando assim a qualidade de vida dos indivíduos atópicos, os quais possuem níveis altos de IgE. A utilização de anticorpo monoclonal IgE específico, conhecida como terapia anti-IgE à base de omalizumab (Xolair), usada em alguns casos graves de asma, tem a função de se ligar a IgE livre, mas não é capaz de se ligar a IgE associada ao receptor específico FcεRI presente nos mastócitos, por exemplo. Além disso, a exigência de muitas doses e o alto custo do medicamento limitam o uso extensivo desse tratamento (Ward, Dana E. *et al.*, 2018).

No presente trabalho, propomos uma abordagem imunoterapêutica alternativa, denominada "bloqueio de IgE". Esta proposta é baseada na interação de aminoácidos livres com a porção Fab-IgE, bloqueando a interação do alérgeno com a IgE específica. Estudos anteriores sequenciaram e identificaram aminoácidos presentes nos epitopos de ligação à IgE dos principais alérgenos de mamona, Ric c 1 e Ric c 3 (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011; Felix *et al.*, 2008). Dentre os aminoácidos identificados, o ácido glutâmico, presente em todos os seis epitopos sequenciados, é responsável pela interação do alérgeno com a IgE (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011). Aminoácidos livres, quando incubados com anti-albumina 2S de mamona, funcionam como bloqueadores de ligação à IgE, impedindo a desgranulação dos mastócitos e a subsequente liberação de histamina dos mastócitos ativados (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011).

Nesse sentido, propomos a investigação do uso do ácido glutâmico e compostos análogos, apresentando modificações em suas cadeias laterais, como agentes bloqueadores de IgE em testes *in vivo* como uma abordagem alternativa como abordagem alternativa para o tratamento da alergia.

## 1.1 - Alérgenos Vegetais

Alérgenos são antígenos específicos com propriedades que os tornam capazes de sensibilizar, induzir o sistema imunológico a produzir anticorpos de alta afinidade principalmente da classe IgE e desencadear uma reação alérgica no indivíduo sensibilizado (Aalberse, 2000). A maioria dos alérgenos identificados até o momento são proteínas solúveis em água com um peso molecular entre 5 kDa e 50 kDa, que possuem locais específicos denominados epitopos, que podem ser reconhecidos por anticorpos e provocar resposta imune (Kumar *et al.*, 2012; Woodfolk *et al.*, 2015).

As proteínas presentes nas plantas podem desempenhar diferentes funções, tais como, reserva energética nas sementes, atividade enzimática, sistema estrutural e também podem desempenhar função de defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos (Nakamura e Teshima, 2013). Os tecidos vegetais, muitas vezes utilizados na alimentação humana, contêm milhares de diferentes proteínas, entre elas muitas capazes de sensibilizar através do trato gastrointestinal e desencadear respostas imunológicas em indivíduos atópicos, sendo, portanto, classificadas como alérgenos (Breiteneder e Radauer, 2004). As proteínas de armazenamento de sementes e proteínas transportadoras de lipídeo não específico, geralmente, causam reações anafiláticas com mais frequência do que outras. São predominantes em praticamente todas as sementes, inclusive nozes, legumes, cereais, grãos e sementes genuínas. Dentre as proteínas de reserva de plantas, as albuminas 2S constituem um dos alérgenos mais potentes (Blazowski *et al.*, 2019).

Aproximadamente, 5-10% das crianças em fase pré-escolar em alguns países ocidentais é afetada por algum tipo de alergia alimentar. Dentre os tipos de alergia alimentar com maior prevalência estão a alergia a amendoim 3%; gergelim 0,8%; e também a algumas fontes animais como ovo 8,8% e leite de vaca 2,7% (Tang e Mullins, 2017). A maioria dos alérgenos alimentares de plantas pertence a apenas algumas famílias de proteínas, indicando que as estruturas conservadas estejam envolvidas nas propriedades alergênicas. Os alérgenos inalantes das plantas estão presentes predominantemente no pólen e podem causar rinoconjuntivite, asma, edema, urticária e anafilaxia (Hoffmann-Sommergruber, 2000).

As proteínas alergênicas são agrupadas na mesma família quando possuem uma identidade residual igual ou maior do que 30%; ou se apresentarem menor identidade

na sua sequência, porém apresentam funções e estruturas similares. Nesse último caso, as famílias com características estruturais e funcionais semelhantes são agrupadas em superfamílias (Breiteneder e Radauer, 2004). Os grandes grupos de proteínas alergênicas presentes nos vegetais pertencem as superfamílias cupin e prolamina e às famílias de proteínas do sistema de defesa de plantas (Breiteneder e Mills, 2005).

A superfamília cupin inclui proteínas alergênicas de armazenamento de sementes do tipo vicilina e leguminina presentes na soja, no amendoim e nas nozes. Já a superfamília prolamina inclui outros importantes tipos de alérgenos de leguminosas, nozes, cereais, frutas e vegetais como as proteínas albuminas 2S. A existência da superfamília da prolamina é baseada na presença de um esqueleto conservado de 8 resíduos de cisteína. Todas as proteínas desta supefamília possuem baixo peso molecular e são caracterizadas por seu alto teor de prolina e ou glutamina. Nesta família estão incluídas também as proteínas transportadoras de lipídeo não específico (nLTPs), inibidores de  $\alpha$ -amilase/protease tipo Cereal e a prolamina de cereais. Além disso, existem outros alérgenos pertencentes aos grupos das “proteínas relacionadas à patogênese” e profilinas. (Breiteneder e Radauer, 2004).

As albuminas 2S, são definidas com base no seu coeficiente de sedimentação (Youle e Huang, 1981) e representam um grupo importante presente em diversas plantas dicotiledôneas, além de serem os principais alérgenos de plantas. São proteínas heterodiméricas, ricas em  $\alpha$ -hélices e, apresentam massa molecular de 10.000 - 18.000 Da e altos teores de arginina, serina e glutamina. Algumas delas são inibidoras de proteases e outras podem propriedades antifúngicas e antimicrobianas (Silva, Da *et al.*, 1996; Moreno e Clemente, 2008; Oliveira, Lima e Machado, 2010). Muitos alérgenos presentes nas sementes são da classe das albuminas 2S podendo ser encontrados em diversas plantas, tais como amendoim, Ara h 6 e Ara h 7 (Kleber-Janke *et al.*, 1999), castanha (Breiteneder e Mills, 2005), gergelim (Wolff, N. *et al.*, 2003) e girassol, na mostarda, Sin a 1 e Bra j 1 (MenéndezArias *et al.*, 1988; Monsalve *et al.*, 1993), em nozes, Jug r 1 (Robotham *et al.*, 2002), e na soja (Lin *et al.*, 2004). Estas proteínas possuem estruturas semelhantes, o que poderia promover reações cruzadas entre tais alérgenos (Breiteneder e Radauer, 2004). Estudos prévios elucidaram a estrutura de alguns alérgenos vegetais e seus epitopos alergênicos foram identificados, como mostrado na Tabela I.



**Tabela I:** Alérgenos vegetais da classe das albuminas 2S com seus epitopos mapeados

Alérgeno	Espécie (nome comum)	Epitopos	Referência
Ara h 2	<i>Arachis hypogaea</i> (Amendoim)	10 (contínuos ou lineares)	(Lehmann et al., 2003)
Ses i 2	<i>Sesamum indicum</i> (Gergelim)	9 (contínuos ou lineares)	(Wolff et al., 2004)
Jat c 1	<i>Jatropha curcas</i> (Pinhão-manso)	5 (contínuos ou lineares)	(Maciel et al. 2009; Crespo et al., 2016)
Ric c 3	<i>Ricinus communis</i> (Mamona)	4 (contínuos ou lineares)	(Machado e Silva, 1992; Félix, 2006, Carrielo Gama 2006)
Ric c 1	<i>Ricinus communis</i> (Mamona)	2 (contínuos ou lineares)	(Sharief e Li, 1982; Thorpe et al., 1988;; Félix, 2006, Carrielo Gama 2006)
Sin a 1	<i>Sinapis alba</i> (Mostarda amarela)	1 (contínuo ou linear)	(Wolff et al., 2003)
Jug r 1	<i>Juglans regia</i> (Nozes)	1 (contínuo ou linear)	(Robotham et al., 2002)

Diversas oleaginosas, apresentam alérgenos pertencentes à classe das albuminas 2S também no pólen, dessa forma seu plantio pode promover processos alérgicos em indivíduos atópicos, através da dispersão de alérgenos no ar. Dentre as oleaginosas, com alérgenos no pólen, está a soja (*Glycine max* L.), o girassol (*Helianthus annuus* L.), o algodão (*Gossypium* spp.), a colza (*Brassica napus* L.), a mamona (*Ricinus communis* L.), o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) (Oliveira, Lima e Machado, 2010).

### 1.2 – Mamona – oleaginosa de interesse econômico

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa considerada uma cultura importante, com relatos desde a antiguidade do uso do óleo extraído das suas

sementes para fins medicinais, por exemplo. Foi utilizada pela primeira vez como uma pomada há 4.000 anos no Egito, de onde se espalhou para outras partes do mundo, incluindo Grécia e Roma, onde foi usada como laxante há 2.500 anos (Chan *et al.*, 2010; Hayes, 1990).

Apesar de ser uma planta muito utilizada para diversos fins, sua origem não é muito bem esclarecida, porém alguns autores afirmam que a mamona é nativa da África tropical, tendo se adaptado em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais úmidas e pode ser encontrada naturalizada e cultivada em todos os países de clima temperado do mundo (Figura 2) (Azevedo e Lima, 2001; Scholz e Silva, da, 2008; Chan *et al.*, 2010; Foster *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2019).



**Figura 2:** Mamona (*Ricinus communis* L.) e suas estruturas, folhas e frutos. Disponível em: <http://www.projetoverdejar.com/2018/03/calda-de-mamona.html> em: 21/01/2019.

O crescente cultivo da mamona é incentivado pelas várias aplicações, principalmente, do óleo extraído das sementes desta planta, o qual é utilizado para fins industriais. Este componente possui alta concentração (~90%) de ácido graxo ricinoléico, tornando-o uma importante matéria-prima usada para fabricação de cosméticos, fármacos, polímeros, lubrificantes e também é viável para a produção do biodiesel (Ogunniyi, 2006; Berman, Nizri e Wiesman, 2011; Chambi *et al.*, 2014). Considerando seu alto valor econômico e o seu fácil crescimento em ambientes desfavoráveis, a mamona tem sido amplamente cultivada em países tropicais e subtropicais (Xu *et al.*, 2019). Os principais produtores são Índia, China e Brasil. No Brasil a mamona é cultivada, praticamente, em todas as regiões, no entanto, por ser uma planta resistente à seca e adaptável à temperatura elevada, abrange maior área de cultivo na região nordeste. Os Estados da Bahia e do Piauí são os principais produtores, sendo que o primeiro contribui com 85,7% e 82% da produção. (Freitas, 2011; Hani e Mohamed, 2015).

Durante o processamento industrial das sementes da mamona para obtenção do óleo é gerado um co-produto chamado torta. Cada tonelada de óleo produzido implica na formação de 1,13 toneladas de torta (Lima *et al.*, 2011). O principal uso da torta residual da extração do óleo de mamoneira é como adubo orgânico, que se constitui em um excelente fertilizante. A adição de torta de mamona no solo, com dosagens variando de acordo com a cultura e o tipo de solo e da riqueza ou não de nutrientes, além de suprir as necessidades nutricionais das plantas, aumenta o pH do solo, eleva o conteúdo de carbono e promove a melhoria geral na parte física do solo (Fornazieri Júnior, 1986; Lima *et al.*, 2011).

Apesar de ser rica em proteínas e fibras, o uso da torta obtida a partir do processamento das sementes da mamona não é recomendado como ração animal por ser tóxica, porque contém ricina, ricinina e alérgenos denominado de CB-1A (Castor-bean allergen), proteínas pertencentes à classe das albuminas 2S (Youle e Huang, 1981). Os trabalhadores que manuseiam a torta, podem ser sensibilizados, ao entrar em contato com as substâncias alergênicas que estão presentes neste produto. Atualmente sabe-se que o complexo alergênico CB-1A é formado por cerca de 20 isoformas de albuminas 2S com massa molecular entre 10 e 14 kDa. As duas isoformas alergênicas, predominantes, Ric c 1 e Ric c 3 já foram seqüenciadas e tiveram suas características físicoquímicas e biológicas determinadas (Youle e Huang, 1981; Silva Jr., et al., 1996; Felix *et al.*, 2008).

### **1.3 - Componentes alergênicos**

Muitos alérgenos vegetais são constituintes das sementes que, como conseqüência, também podem ser encontrados em alguns produtos derivados do processamento para obtenção do óleo contido nessas estruturas. Outro fato a ser considerado é que alguns desses compostos também podem ser encontrados em outras partes da planta, como a proteína alergênica albumina 2S da mamona presente na semente e também no pólen desta oleaginosa. Desse modo, a presença de alérgenos em *Ricinus communis* limita as aplicações econômicas dessas oleaginosas, bem como a torta gerada como co-produto, devido ao risco que representa para os trabalhadores e a população que vive nas proximidades.

#### **1.3.1 - Albumina 2S de mamona**

As albuminas 2S são proteínas de reserva presentes não apenas nas sementes de mamona, como também em muitas plantas dicotiledôneas. Embora a maioria das



albuminas 2S apresentem somente a função de reserva, a qual é consistente com sua composição de aminoácidos e seu padrão de acumulação auxiliando durante o processo de germinação, algumas delas também são descritas com atividades antifúngicas e inibidoras de proteases e, também apresentam propriedades alergênicas (Machado e Silva, 1992; Pantoja-Uceda *et al.*, 2004).

As albuminas 2S são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, como um precursor proteico de alto peso molecular. Posteriormente, este precursor sofre processamento pós-traducional, por endopeptidases e carboxipeptidases, perdendo alguns fragmentos peptídicos para assim dar origem as isoformas. A glicosilação dessas proteínas pode ocorrer durante a síntese proteica e, os carboidratos incorporados são, em sua maioria, manose e glicosamina (Jolliffe *et al.*, 2004).

Historicamente, no ano de 1943, Spies e Coulson isolaram da semente de mamona uma fração proteica de baixo peso molecular, estável ao calor, que foi denominada CB-1A (castor bean allergens). No ano de 1947 a hipersensibilidade desencadeada por mamona foi descrita pela primeira vez e em 1977, Li e colaboradores isolaram e caracterizaram uma proteína de baixo peso molecular e alto “teor” de glutamina das sementes de *Ricinus communis* que mostrou propriedades similares àquelas da proteína anteriormente isolada de mamona. Posteriormente, no ano de 1978, Youle e Huang concluíram que CB-1A era a mesma proteína de reserva caracterizada por Li *et al.* em 1977. Em 1982, Sharief e

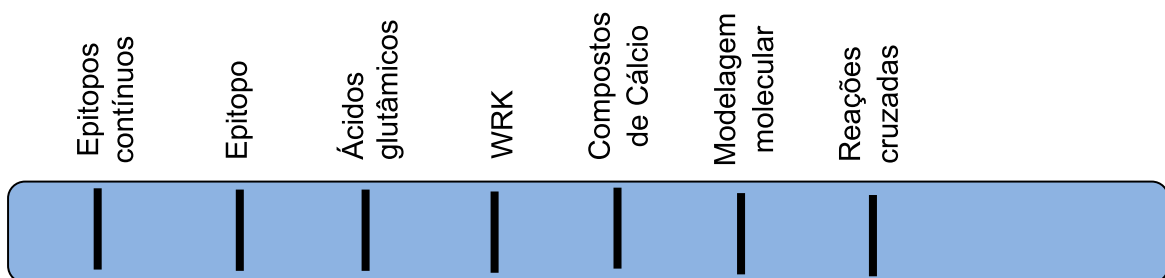
Li isolaram e sequenciaram uma proteína das sementes de *Ricinus communis* L. (Ric c 1), com coeficiente de sedimentação 2S, constituída de duas subunidades unidas por pontes de enxofre (Sharief e Li, 1982). A menor contendo 34 aminoácidos (Ric c 1 cadeia leve) com massa molecular aparente de 4 kDa e a subunidade maior composta de 61 aminoácidos (Ric c 1 cadeia pesada) com massa molecular de 7 kDa. No ano de 1992, Machado e Silva isolaram e seqüenciaram um segundo alérgeno da semente de mamona, denominado de Ric c 3, tendo peso molecular em torno de 11 kDa, presente no mesmo precursor de 29 kDa de Ric c 1 (Silva, Da *et al.*, 1996). As isoformas alergênicas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são sintetizadas em um único precursor com 237 resíduos de aminoácidos, cerca de 29 kDa. Este alérgeno teve sua estrutura completamente elucidada no ano de 1996. Em 2003, outras proteínas alergênicas, minoritárias, pertencentes à classe das albuminas 2S foram identificadas nas sementes de mamona por Machado e colaboradores (Machado *et al.*, 2003).

As propriedades alergênicas das albuminas 2S de mamona são resistentes à desnaturação térmica e química, podendo, mesmo após os tratamentos de desnaturação, desencadear alergia por contato bem como por inalação (Machado e Silva, 1992; Silva *et al.*, 1996).

### 1.3.2 - Estrutura das albuminas 2S

A interação entre a proteína alergênica e a molécula de anticorpo é específica e ocorre através da região presente no alérgeno chamada epitopo ou determinante antigênico. Os epítomos podem ser divididos em dois tipos, lineares (contínuos) e conformacional (descontínuo). Epítomos lineares compreendem seqüências contínuas de aminoácidos (AA), enquanto os conformacionais são formados por resíduos de AAs não sequenciais espacialmente adjacentes na proteína estabelece sua conformação enovelada (Wolff, N *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2012; Matsuo, Yokooji e Taogoshi, 2015). Sabe-se que os epítomos contínuos são mantidos após desnaturação, ao contrário dos epítomos conformacionais (Aalberse e Cramer, 2011; Schein, Ivanciuc e Braun, 2005). O epitopo presente no alérgeno é reconhecido pela imunoglobulina do tipo E específicas, desencadeando uma reação alérgica (Matsuo, Yokooji e Taogoshi, 2015a). O mapeamento de epítomos lineares utilizando peptídeos sintéticos, tem sido uma importante ferramenta na identificação dos sítios de ligação do alérgeno à IgE (Tanabe, 2007).

Com relação ao estudo dos epítomos presentes nas albuminas 2S de mamona (figura 3), Vieira (2002) observou que ambas as isoformas isoladas do “pool” de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, mesmo após serem submetidas à desnaturação, são capazes de desencadear a desgranulação de mastócitos, indicando a presença de epítomos contínuos nas duas isoformas, um resumo da evolução dos estudos das estruturas das albuminas 2S é mostrado na Figura 3. Dando prosseguimento aos estudos, Mayerhoffer (2004) caracterizou um epitopo contínuo da cadeia pesada de Ric c 1 das albuminas 2S de *Ricinus communis* (Vieira, 2002; Mayerhoffer, 2004).



## 2002                    2004 2006 2006 2008 2011 2011

**Figura 3:** Evolução do estudo dos epitopos de IgE presentes nas albuminas 2S de mamona. 2002– Vieira demonstra a presença de epitopos contínuos Ric c1 e Ric c3; 2004 – Mayerhoffer identifica 1 epitopo (Desgranulação de mastócitos); 2006 – Felix demonstra a participação de resíduos de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e aspártico) nos 5 epitopos; 2006 – Carriello-Gama confirma a participação do glutâmico no epitopo, com o tratamento utilizando WRK; 2008 – Oliveira inicia modificações no grupamento lateral deste aminoácido utilizando compostos de cálcio; 2011 - analisaram as estruturas tridimensionais das principais isoformas alergênicas de mamona, Ric c 1 e c Ric c 3, pela construção de um modelo comparativo de Ric c 1; 2011 – Deus-de-Oliveira Investiga da reação cruzada entre as albuminas 2S de mamona e alérgenos de outras fontes (adaptado de Deus-de-Oliveira, 2013).

Posteriormente, Felix e colaboradores em 2008 identificaram seis epitopos alergênicos, dois em Ric c 1 e quatro em Ric c 3, como mostrado na Tabela II.

**Tabela II:** Características estruturais dos peptídeos sintéticos derivados de isoformas de albuminas 2S de mamona.

	Isoforma	Resíduos	Sequência Primária
P0	Ric c 1 (cadeia pesada)	22 ao 40	EGLRQAIEQQQSQGQ
P1	Ric c 3 (cadeia leve)	1 ao 15	ESKGEREGSSSQQCR
P2	Ric c 3 (cadeia leve)	16 ao 31	QEVQRKDLSSCERYLR
P3	Ric c 1 (cadeia leve)	11 ao 24	QEQNLRQCQEYIK
P4	Ric c 3 (cadeia pesada)	30 ao 39	DECQCEAIKYIAEDQ
P5	Ric c 3 (cadeia pesada)	40 ao 54	LHGEESERVAQRAGE

O trabalho utilizando os peptídeos sintéticos realizado por Felix *et al.* (2008) identificou quatro epitopos contínuos em Ric c 3 e dois em Ric c 1. Nesses epitopos foram observados a presença de pelo menos dois resíduos de aminoácidos ácidos, ácido glutâmico ou ácido aspártico, a uma distância de no máximo 6 resíduos em cada epitopo ligante de IgE. Para desencadear o processo de desgranulação de mastócitos, basófilos e consequente liberação de mediadores, como a histamina para disparar o processo alérgico é fundamental a ligação do epitopos à duas moléculas de IgE pré-fixadas aos mastócitos ou basófilos (Felix *et al.*, 2008). Portanto, esta característica suporta a hipótese de que os grupamentos carboxílicos laterais destas cadeias podem ser importantes na interação com as moléculas de IgE. A partir do conhecimento dos epitopos ligantes de IgE por Felix em 2006 e por Mayerhoffer em 2004, Carriello-Gama em 2006, tratou as albuminas 2S, bem como peptídeos sintéticos correspondentes aos epitopos identificados, com o reagente Woodward's Reagent K (WRK – N-etil-5-fenilisoazolium-3`-sulfonato). Este reagente reage especificamente com o

grupamento carboxílico presente nestes aminoácidos (Dunn e Anfinsen, 1974). Carriello-Gama em 2006 mostrou, por espectrometria de massas, a modificação dos resíduos de glutamato nos peptídeos sintéticos e a inativação das atividades ligantes de IgE. Nascimento e colaboradores 2009, analisaram as estruturas tridimensionais das principais isoformas de mamona, Ric c 1 e Ric c 3, pela construção de um modelo comparativo de Ric c 1 com base na estrutura de ressonância magnética nuclear (RMN) de Ric c 3. Os epitopos alergênicos foram localizados nesta estrutura (Nascimento, 2011).

Conhecendo o envolvimento dos ácidos glutâmicos na ligação à IgE, ensaios *in vitro* foram propostos utilizando aminoácidos livres como agente bloqueadores de IgE. A hipótese inicial era que o ácido glutâmico livre se ligue à porção Fab da IgE ocupando o sítio de interação da IgE com o epítipo, impedindo a ligação do alérgeno e, portanto, a deflagração da alergia. Desta forma, Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011 demonstrou que soro de ratos contendo IgEs específicas anti-albumina 2S de mamona, quando incubados com ácido glutâmico livre perdiam a capacidade de disparar a resposta alérgica. Esta atividade foi avaliada por ensaios de desgranulação de mastócitos isolados de ratos. Alérgenos de mamona apresentam resposta cruzada com alérgenos de diversas fontes alimentares como peixe, camarão e milho, bem como alguns aeroalérgenos presentes na poeira e no tabaco (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011). A incubação de soro contendo IgE anti albuminas 2S de mamona, com o ácido glutâmico também bloqueou a resposta cruzada com os alérgenos descritos.

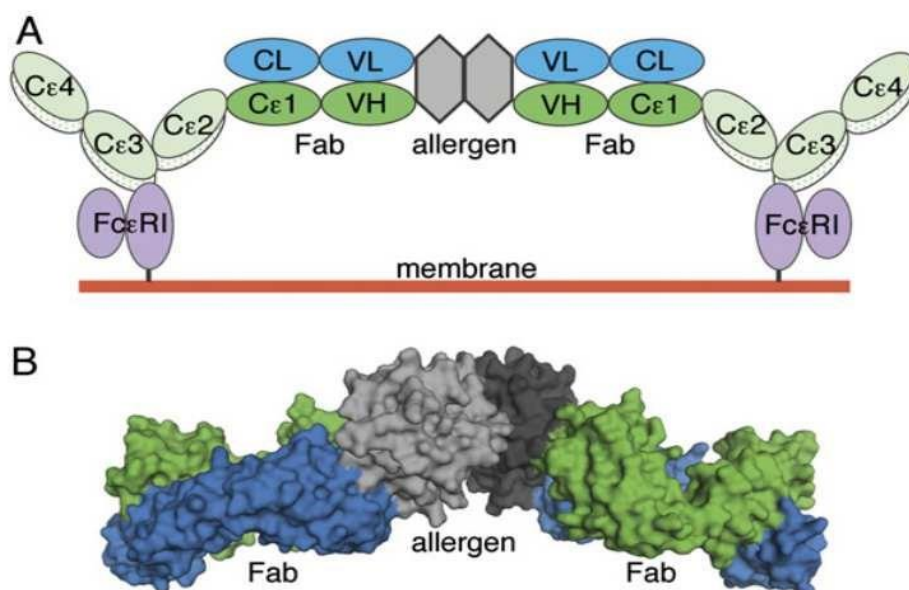
#### **1.4- Aspectos imunológicos da alergia alimentar**

A prevalência da alergia alimentar vem aumentando nas últimas décadas e tornou-se um importante problema de saúde mundial, podendo afetar todas as faixas etárias e diminuir significativamente a qualidade de vida da população afetada. Apesar do risco de reações alérgicas graves, e até mesmo a morte, não existe cura para AA, a doença pode apenas ser controlada ao se evitar o contato com o alérgeno e pelo tratamento dos sintomas (Tang e Mullins, 2017). Dentre os alérgenos alimentares mais comuns estão amendoim, nozes e leite de vaca (Blazowski *et al.*, 2019).

A maioria das alergias alimentares são mediadas por IgE e os principais sintomas são: reações cutâneas, urticária, angioedema, rubor e prurido e sintomas respiratórios, que ocorrem frequentemente durante reações sistêmicas e são importantes para diagnóstico de anafilaxia grave. Outros sintomas incluem congestão

nasal, rinorréia, taquipnéia, respiração ofegante e tosse. Em casos de comprometimento grave das vias aéreas, edema laríngeo e/ou broncoespasmo, edema e obstrução da mucosa nas vias inferiores, podendo levar ao colapso das vias aéreas; reações oculares também podem ocorrer, tal como, prurido, irritação, lacrimejamento e inchaço. No trato gastrointestinal os principais sintomas são prurido oral, desconforto e angiodema nos lábios, língua e orofaringe, também pode ocorrer êmese, náuseas, diarreia e cólica (Sicherer e Sampson, 2014).

Os alérgenos alimentares, em geral, incluem proteínas e glicoproteínas que tem a capacidade de promover a ligação cruzada entre as IgEs. A IgE é uma molécula constituída de duas cadeias polipeptídicas, pesada e duas leve, idênticas. A cadeia pesada  $\epsilon$  da IgE contém quatro domínios constantes, C $\epsilon$ 1-C $\epsilon$ 4, e um domínio variável, já a cadeia leve contém um domínio constante e um domínio variável como mostrado na Figura 4A (Niemi *et al.*, 2007).



**Figura 4:** Esquema da ligação de uma proteína alergênica à IgE (A), formando um dímero (em cinza), a porção Fab de duas moléculas de IgE (cadeia leve em azul e cadeia pesada em verde) ligadas à receptores FcεRI na superfície de mastócitos pela porção Fc da IgE. Diferentes domínios da IgE são mostrados. Para maior clareza o segundo fragmento Fab da IgE não é mostrado. B - A estrutura cristalográfica resolvida contendo o dímero da BLG (beta-lactoglobulina) (cinza) em complexo com dois fragmentos do domínio 1 da porção Fab (D1/Fab) (NIEMI et al., 2007).

Muitos potenciais alérgenos podem ser desnaturados pela acidez estomacal, embora alguns deles sejam bastante resistentes a estas condições. Adicionalmente, o uso de medicamentos para úlceras que inibe a digestão gástrica tem um efeito na fase de indução da sensibilização (Knol *et al.*, 2019; Matsuo, Yokooji e Taogoshi, 2015a). Estudos baseados em desafios alimentares orais indicam que a prevalência de alergia alimentar varia entre 5 e 10% em crianças e adultos em alguns países ocidentais. O estudo clínico observando os níveis de IgE específica em indivíduos atópicos, revelou alergia a ovo 8,8%; alergia a amendoim 3%; gergelim alergia a sementes 0,8%. A prevalência estimada de alergia ao leite de vaca foi 2,7% baseado no histórico clínico e resultados positivos (Tang e Mullins, 2017).

No Brasil, a distribuição de pacientes com IgE específica para alérgenos alimentares mostrou a prevalência para peixe (30,2%), ovo (24,5%), leite de vaca (20,3%), trigo (20,1%) e amendoim (14,7%) (Naspitz, 2004). O aumento do número

de pessoas que possuem alergia às proteínas alimentares tornou-se uma preocupação de saúde pública mundial. A alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) é uma das principais e potencialmente fatal entre as alergias alimentares. A APLV é o tipo de alergia mais comum em recém-nascidos e crianças afetando de 2% a 8% dessa população (Fiocchi *et al.*, 2010).

As reações imunologicamente mediadas por IgE são desencadeadas por vários potenciais antígenos presentes no leite de vaca (Mousan e Kamat, 2016). Os efeitos adversos da APLV são resultados de hipersensibilidade a uma ou mais proteínas do leite (Hill *et al.*, 1986; Vandenplas *et al.*, 2007; Knol *et al.*, 2019). As reações imunomediadas às proteínas, podem ser classificadas como reações imediatas, que são tipicamente mediadas por IgE, ou de início tardio, geralmente não mediada por IgE ou mediadas por células (Wal, 1998; Calabria, Dietrich e Hagan, 2009).

As reações alérgicas provocada pelo leite de vaca podem se apresentar como reações sistêmicas generalizadas, ou seja, um quadro anafilático, ou reações gastrointestinais, cutâneas e/ou respiratórias mediadas por IgE. Pacientes que apresentam sintomas de reações mediadas por IgE normalmente são positivos para teste cutâneos e/ou apresentam IgE sérico para proteínas do leite (Hill *et al.*, 1986; Vandenplas *et al.*, 2007). A anafilaxia induzida pelo leite de vaca é a reação alérgica mais grave a proteínas do leite de vaca. A anafilaxia é uma reação alérgica sistêmica ou generalizada grave que potencialmente pode levar a morte (Sicherer e Sampson, 2014). Os tratamentos convencionais para a APLV envolvem evitar ou substituir os alimentos alergênicos e tratar os sintomas das reações alérgicas com medicamentos, contudo, uma eliminação prolongada do alimento da dieta pode induzir desnutrição grave (Boyce *et al.*, 2011; Koletzko *et al.*, 2012; Sicherer e Sampson, 2014). No entanto, diferentes formas de tratamento vêm sendo propostas, por exemplo, imunoterapia alérgeno específica, indução de tolerância oral por uso de fórmulas hipoalérgicas, terapia alérgica não específica com anti-IgE e com probióticos (Skripak *et al.*, 2007; Vandenplas *et al.*, 2019).

#### **1.4.1 – Alérgenos do leite de vaca**

As  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, e as caseínas ( $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$ - e -caseína) são as proteínas que mais induzem a produção de IgE específica (Lam *et al.*, 2008), sendo portanto consideradas as mais alergênicas. A reatividade cruzada entre o leite de vaca, e o leite de cabra, ovelha e búfalo já foi comprovada. Assim, indivíduos

alérgicos devem ser cuidadosos na ingestão desses alimentos (Bellioni-Businco *et al.*, 1999; Restani *et al.*, 2002; Sheehan, Gardynski e Phipatanakul, 2009). Existem 11 alérgenos de leite bovino classificados no site oficial da Organização Mundial da Saúde. Dentre eles, caseína e alpha-lactalbumina são as principais proteínas alergênicas do leite de vaca. A caseína constitui aproximadamente 80% das proteínas presentes no leite de vaca (Fuc e Złotkowska, 2019). Essas proteínas fosforiladas são resistentes ao calor, mas são susceptíveis à enzimas digestivas. A fração de caseína é composta por quatro componentes proteicos majoritários, Bos d 9 contendo 199 aminoácidos e com o peso molecular de 23,6 kDa, Bos d 10 contendo 207 aminoácidos e peso molecular de 25,2 kDa, Bos d 11 com 209 aminoácidos e com peso molecular de 24 kDa e Bos d 12 que apresenta 169 aminoácidos em sua sequência e peso molecular de 19 kDa (Manuyakorn e Tanpowpong, 2018). A maior parte dessas proteínas se encontra em uma partícula coloidal chamada de micela de caseína. A proporção de proteínas na fração de caseína são 37% para  $\alpha$ 1-caseína, 37% para  $\alpha$ 2-caseína, 13% para  $\beta$ -caseína e 13% para  $\kappa$ -caseína (Fuc e Złotkowska, 2019; Manuyakorn e Tanpowpong, 2018). A  $\alpha$ 1-caseína não possui estrutura molecular ordenada e aproximadamente 50% das amostras de soro de pacientes diagnosticados para alergia ao leite de vaca reage com a  $\alpha$ 1-caseína (Hochwallner *et al.*, 2014).

Busse e *et al.* (2002), identificaram 10 epitopos contínuos de ligação de IgE na  $\alpha$ 2-caseína, sendo quatro deles (83NEINQFYQKFPQYLQYLY100,143STEVFTKTKLTEE158,157EEKNRLNFLKKISQRYQ172, 165KKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQB188) reconhecidos por 77% dos pacientes. Diversos epitopos de ligação de IgE foram mapeados para  $\beta$ -Caseína, inclusive alguns epitopos de célula B, também foram encontrados epitopos de ligação a IgE que são resistentes à digestão gastrointestinal. A  $\alpha$ -Lactalbumina é uma proteína de ligação ao cálcio que desempenha um papel fundamental na biossíntese de lactose. Além disso, apresenta alta estabilidade térmica (Busse *et al.*, 2002). Nessa proteína foram encontrados vários epitopos de ligação a IgE, sendo três localizado superfície da proteína (Hochwallner *et al.*, 2014). Já a  $\beta$ Lactoglobulina é a proteína mais abundante no soro do leite, e alguns epitopos de ligação a IgE já foram mapeados para esta proteína. Alguns deles são reconhecidos por mais de 75% dos pacientes com alergia ao leite de vaca (Han *et al.*, 2008; Mousan e Kamat, 2016)

### **1.5 - Relevância clínica das reações cruzadas entre alérgenos**



A reatividade cruzada ocorre quando a IgE reconhece epitopos de vários alérgenos. Clinicamente, o reconhecimento de vários alérgenos de diferentes fontes dificulta o diagnóstico clínico preciso para qual alérgeno o indivíduo foi sensibilizado (Mueller, 2017). De fato, muitas análises das proteínas alergênicas tem identificado semelhanças estruturais na sequência de aminoácidos que corroboram com as reações cruzadas. No entanto, ainda há pouca informação disponível para estabelecer uma relação causal entre a estrutura da proteína e os sintomas clínicos (Pastorello *et al.*, 2001; Mitta *et al.*, 2006; Minkiewicz, Sokolowska e Darewicz, 2015; Mueller, 2017). O componente alergênico caracterizado de maneira mais abrangente dentre os alérgenos vegetais (Tabela I) são as albuminas 2S, assim como outras proteínas, têm a função de reserva nas sementes de oleaginosas. Esses alérgenos são amplamente distribuídos entre várias plantas e podem provocar reações alérgicas em indivíduos atópicos, mesmo tendo sido sensibilizado contra alérgenos de fontes diferentes (Matsuo, Yokooji e Taogoshi, 2015). Os indivíduos predispostos, podem ser sensibilizados após o contato, ingestão ou inalação do alérgeno. Sabe-se que a sensibilização a alérgenos presentes no pólen das plantas pode ocorrer de forma isolada ou associada à sensibilização a outros alérgenos (Minkiewicz, Sokolowska e Darewicz, 2015; Tanabe, 2007).

A reatividade cruzada pode ocorrer entre alérgenos do pólen e frutas ou vegetais, a polinose de bétula, por exemplo, está fortemente associada à alergia alimentar a certos frutos da família Rosaceae (como maçãs, cerejas, e damascos), nozes (como avelãs) e vegetais da família Apiaceae (como aipo e cenoura). O principal alérgeno do pólen de bétula, Bet v 1, desempenha um papel substancial no início dessas alergias alimentares (síndrome dos frutos de bétula) (Tanabe, 2007). De acordo com Aalberse (2000) para que a reatividade cruzada entre alérgenos ocorra é necessário haver de 35% a 70% de similaridade de aminoácidos na sequência proteica (Aalberse, 2000).

A maioria das reações desencadeadas por alérgenos 2S, ocorrem através dos epitopos lineares compartilhados entre eles (Aalberse, 2000; Moreno e Clemente, 2008). Nos últimos anos, as albuminas 2S têm ganhado maior atenção de pesquisadores e consumidores, especialmente após relatos de que pacientes alérgicos a castanha do Brasil reagiram positivamente a extratos de alérgenos da soja em ensaios “Skin Prick Test” e ensaios de ligação à IgE (Moreno e Clemente, 2008). As albuminas 2S, Ara h 2 e Ara h 6, também constituem os principais alérgenos presentes no amendoim, promovendo uma reatividade clínica, considerando os níveis

de IgE específica em relação a essas proteínas. Sugere-se que a ligação da IgE ao Ara h 6, resulta essencialmente de reatividade cruzada com outros alérgenos de amendoim (Blanc *et al.*, 2009; Hazebrouck *et al.*, 2019).

## **1.6 – Abordagens terapêuticas para o tratamento da alergia**

Estratégias terapêuticas vem sendo estudadas nos últimos anos com o objetivo de desenvolver métodos eficazes e seguros para aliviar os sintomas desencadeados pelo organismo em resposta a alérgenos de diversas fontes. O conjunto de informações obtidas sobre os alérgenos influenciou na melhor compreensão do desencadeamento das alergias, com isso surgiram novas tendências de diagnósticos e tratamentos (Jensen-Jarolim, Jensen e Canonica, 2017). A tabela III mostra, resumidamente, as abordagens terapêuticas podem ser alérgeno-específica ou não.

. As terapias alérgeno-específica incluem a imunoterapia oral com extratos dos alérgenos, e recentemente tem sido utilizadas imunoterapia sublingual e epicutânea com proteínas modificadas, vacinas de DNA de proteínas de membrana associadas a lisossomos (do inglês *lysosomal-associated membrane protein* - DNA LAMP). Além disso, estudos relacionados ao uso de agentes imunomoduladores, estão sendo desenvolvidos e, dependendo dos resultados, também podem se tornar importantes opções de tratamento (Nowak-we e Sampson, 2013; Lanser *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Dantzer-Wood, 2019).

As principais opções de tratamentos medicamentosos existentes incluem: o uso de anti-histamínicos e imunoterapias alérgeno-específicas tais como: vacinas usando peptídeos hipoalergênicos recombinantes e peptídeos sintéticos. Outras opções que têm sido utilizadas, são as terapias não específicas para alérgenos, entre elas, anticorpos monoclonais anti-IgE, anti-receptores específicos da IgE (Wang *et al.*, 2016). A abordagem baseada no bloqueio de IgE, foi proposta pelo nosso grupo de pesquisa em 2011, está sendo seguida por Ozdemir *et al* (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011; Ozdemir *et al.*, 2016 Wang *et al.*, 2016).

### **1.6.1 – Anti-histamínicos**

Os anti-histamínicos estão entre os medicamentos mais usados por quem sofre de algum tipo de alergia. Esses fármacos têm a função de aliviar os sintomas alérgicos, ou seja, são baseados nas consequências da reação alérgica, já

desencadeada no indivíduo (Wang *et al.*, 2016). Os anti-histamínicos de primeira geração, ou antagonistas dos receptores H1, mesmo em doses terapêuticas, podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis envolvendo o sistema nervoso central, devido à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e falhar na sua seletividade. Os efeitos colaterais podem incluir sonolência, sedação e fadiga que podem levar a uma redução cognitiva, de memória e do desempenho psicomotor (Simons e Simons, 2008; Church e Church, 2013).

Alguns anti-histamínicos de primeira geração como doxepina, difenidramina, pirilamina, clorfeniramina, hidroxizina, prometazina e ciproheptadina são comumente usados para combater os sintomas alérgicos (A.M. e N.R., 2008). Uma nova classe de anti-histamínicos foi desenvolvida, a fim de minimizar os efeitos colaterais. Os antagonistas H1 de segunda geração não atravessam a barreira hematoencefálica tão facilmente e apresentam uma maior seletividade para os receptores H1, diminuindo seus efeitos sedativos em comparação com os medicamentos de primeira geração (Church e Church, 2011). Os medicamentos anti-histamínicos de segunda geração incluem cetirizina, ebastina, epinastina, fexofenadina, loratadina, desloratadina, levocetirizina, e rupatadina. Embora estes fármacos sejam considerados mais seletivos e menos causador de efeitos adversos, alguns medicamentos, por exemplo, levocetirizina, podem causar sonolência, e a fexofenadina também pode causar esse efeito, além disso pode ser necessária mais de uma dose diária. No entanto o tratamento com medicamentos anti-histamínicos não aborda a causa das respostas alérgicas, mas apenas alivia seus sintomas, ou seja, as consequências da reação imune geradas pela alérgeno ( Holm *et al.*, 2011; Church e Church, 2013; Iguchi *et al.*, 2016).

### **1.6.2 – Imunoterapia alérgeno-específica**

A imunoterapia foi concebida em 1911, a partir da qual um tipo de terapia foi desenvolvido utilizando alérgenos como ferramenta para o desenvolvimento de tolerância imunológica nos indivíduos alérgicos (Geraldini *et al.*, 2008). O termo "dessensibilização" foi substituído por "hipossensibilização", "imunoterapia", tornou-se popular apenas na década de 1980, e "imunoterapia específica", é um termo comumente usado. Quando a imunoterapia envolve o uso direto de alérgenos como imunoterapêuticos, o termo apropriado é ASIT (do inglês *Allergen-specific immunotherapy*) (Ring e Gutermuth, 2011).

A ASIT é utilizada há mais de um século e continua sendo um dos poucos tratamentos específicos para antígenos que provocam doenças inflamatórias. Este tipo de terapia consiste na administração gradual de doses de um alérgeno específico ou parte desse alérgeno, com o objetivo de reduzir a sensibilidade e, conseqüentemente, diminuir as reações sintomáticas após uma exposição futura do indivíduo alérgico ao agente natural causador (Meadows *et al.*, 2013; Lanser *et al.*, 2015). A ASIT é uma estratégia terapêutica amplamente utilizada para o tratamento de rinite alérgica, hipersensibilidade induzida por veneno, alergias a alguns medicamentos e asma brônquica leve (Holgate e Polosa, 2008).

Os mecanismos de ação da ASIT ainda não são completamente conhecidos, o que se sabe é que esta pode modular as respostas das células T e B, reduzindo assim a incidência e gravidade de reações adversas mediadas por IgE (Linhart e Valenta, 2012). Algumas das alterações imunológicas que ocorrem durante a ASIT foram elucidadas (Lanser *et al.*, 2015). A ASIT aumenta o nível de anticorpos IgA e IgG4 alérgeno-específicos e diminui o nível de IgE específica. Imunoterapias oral, sublingual e subcutâneas são as mais utilizadas no tratamento da hipossensibilização em vários tipos de alergias. Esses três mecanismos de imunoterapias, no entanto, são específicos para determinados alérgenos, limitando sua eficácia a apenas um tipo de alérgeno (Meadows *et al.*, 2013).

As estratégias que visam melhorar a imunoterapia alérgeno-específica, incluem o uso de alérgenos recombinantes modificados, novos adjuvantes e vias alternativas de administração. Os alérgenos recombinantes são semelhantes aos alérgenos nativos, geralmente equivalentes em estrutura e propriedades, mas com modificações nos seus epitopos que inibem a sua capacidade de desencadear uma resposta alérgica (Valenta e Kraft, 1991; Campana *et al.*, 2011; Valenta *et al.*, 2016). Alérgenos recombinantes derivados de hipoalergênicos foram usados como estratégia imunoterapêutica e observou-se a indução da produção de IgG alérgeno-específico bloqueando anticorpos como um dos principais mecanismos da ASIT (Valenta *et al.*, 2016). No entanto, o bloqueio de IgG, também pode inibir a apresentação de antígeno pelas APCs para células T e, portanto, suprimir a ativação de células T induzidas (Wollmann *et al.*, 2015). ASIT também pode alterar o equilíbrio de células T auxiliares específicas de um perfil Th2 para um perfil de imunidade Th1 específico de alérgenos e pode induzir a secreção de citocinas imunorreguladoras, como interleucina 10, e células T reguladoras (Campana *et al.*, 2011). Sabe-se que a indução de tolerância específica a alérgenos é, portanto, o mecanismo imune essencial da ASIT.

Recombinantes hipoalergênicas derivadas de variantes tem sido produzidas. Linhart e Valenta (2012), por exemplo, produziu, purificou, e caracterizou duas proteínas recombinantes hipoalergênicas híbridas de alérgenos de *Brassica rapa*, Der p 2 (ordem p 2) / 1 C e ordem p 2 / 1S (Linhart e Valenta, 2012). Mutações em resíduos de ácido aspártico nesses alérgenos diminuíram a ligação cruzada à IgE fixada na membrana dos mastócitos sensibilizados diminuindo o potencial alergênico da proteína (Wald *et al.*, 2012). O tratamento de pacientes imunizados com um hipoalergênico variante Bet v1 (alérgeno de bétula) não desenvolveu uma resposta alérgica local, como observado por testes histopatológicos de contato com a pele. Em testes utilizando esta mesma proteína hipoalergênica recombinante em ratos, foi demonstrado um perfil de resposta de tolerância com a produção de citocinas pró-inflamatórias (Campana *et al.*, 2016).

Outra estratégia utilizada é a imunoterapia baseada em peptídeos, a qual vem sendo estudada recentemente. Este tipo de terapia é composta por pequenos peptídeos, destacando-se neles a presença de epítomos ligantes de células T CD4+ que não ativam as células efetoras, não desencadeando assim o processo alergênico, tornando-a uma estratégia segura e eficaz (WAI *et al.*, 2016). Geralmente, extratos alergênicos são produzidos e utilizados em imunoterapias, porém, eles contêm também outros alérgenos e proteínas não alergênicas, não sendo, portanto, um tratamento preciso (Jensen-Jarolim, Jensen e Canonica, 2017).

A imunoterapia usando peptídeos tem algumas vantagens em relação às imunoterapias que usam alérgenos recombinantes. As vacinas que utilizam peptídeos com epítomos de células T podem induzir células T reguladoras. O uso de peptídeos sintéticos derivados de alérgenos contendo epítomos de células T é uma alternativa para a estimulação de células T específicas de alérgenos em ASIT. Esses peptídeos são formados a partir de sequências lineares representando fragmentos de pequenos alérgenos que se ligam ao receptor alérgeno-específico de células T e não reagem com anticorpos IgE, o que lhes dá uma vantagem porque eles não desencadeiam os sintomas alérgicos clássicos mediados pela IgE. O tratamento pode induzir a tolerância das células T pela secreção da citocina imunoregulatória de células T, IL - 10. Uma possível desvantagem de vacinas baseadas em epítomos de células T, é a diversidade desses epítomos existentes, dificultando o tratamento com apenas um ou alguns peptídeos. Outro fator é que este tratamento pode causar sintomas sistêmicos secundários e reduzir a capacidade de induzir bloqueio de IgG (D'Amato, 2006).

As vacinas para alergias baseadas em epítomos de células B de aproximadamente 20 a 40 aminoácidos usam peptídeos que não possuem a capacidade de se ligar a IgE. Os peptídeos devem estar ligados covalentemente a uma proteína transportadora não relacionado aos alérgenos T, a fim de tornar esses peptídeos imunogênicos, capaz de induzir a produção de IgG, que bloqueia a ligação de IgE ao alérgeno correspondente. Valenta *et al.*(2016), demonstraram que o uso de peptídeos alergênicos pode induzir anticorpos IgG para o principal alérgeno do pólen de gramíneas tomilho, Phl p 1, e para os principais alérgenos do pólen de bétula, Bet v 1, diminuindo ainda mais a atividade alergênica dos hipoalérgicos recombinantes (Valenta *et al.*, 2016).

### **1.6.3 – Terapias alérgeno não específicas**

As doenças alérgicas, como asma e a alergia a múltiplos alimentos, impactam significativamente na qualidade de vida das pessoas, tornando-se um desafio social e econômico que não pode ser efetivamente gerenciado com os tratamentos atualmente disponíveis. Sabe-se que as respostas imunes mediadas por IgE são centrais para o desenvolvimento da alergia. Anticorpos IgE se ligam ao seu receptor de alta afinidade (FcεRI) expresso nos mastócitos, eosinófilos e basófilos. A ligação cruzada entre as IgEs pré-fixadas e FcεRI provocada por alérgenos desencadeia a degranulação e liberação de substâncias inflamatórias mediadoras que induzem reações de hipersensibilidade e sintomas alérgicos. A IgE é, portanto, um alvo importante para intervenção terapêutica (Ward, Dana E *et al.*, 2018).

### **1.6.4 - Uso de anticorpos anti-IgE**

A estratégia de inibição da interação entre a IgE e os seus receptores específicos FcεRI, apresenta algumas vantagens a serem consideradas, dentre elas a prevenção da vinculação de IgE ao receptor FcεRI diminuindo o número de FcεRI expresso por célula resultando em baixa reatividade das células ativadas como mastócitos e basófilos, que participam do processo alérgico (Blank, Charles e Benhamou, 2016). A interação das moléculas de IgE com receptores de alta e baixa afinidade podem ser inibidos pelo uso de anticorpos monoclonais anti-IgE, com o objetivo de reduzir a indução de respostas alérgicas (D'Amato, 2006).

Após a exposição ao alérgeno, na fase de sensibilização, a IgE sintetizada pelos plasmócitos pode ser detectada no soro, mas a maior parte encontra-se fixada

aos basófilos e aos mastócitos pelos receptores de alta afinidade (FcεRI). Esses receptores aprisionam a IgE através do terceiro domínio da região constante da cadeia pesada (CH3). Quando ocorre novo contato com o alérgeno específico, inicia-se a fase efetora, com a formação de uma ponte que permite a ligação bivalente de duas moléculas da imunoglobulina E com o alérgeno. Esse processo desencadeia a degranulação celular, com liberação de inúmeros mediadores e citocinas responsáveis pelo processo alérgico (Sarinho e Cruz, 2006).

A terapia com anticorpos anti-IgE (Omalizumab, nome comercial Xolair) foi aprovado pelo FDA dos EUA em 2003 para o tratamento da asma grave mediada por IgE. O cálculo da dose de omalizumab a ser administrada é baseado na concentração sérica total de IgE e o peso corporal do paciente. Estima-se, que a dose deve ser administrada em excesso molar aos níveis circulantes de IgE a fim de reduzir o chamado nível de IgE livre em circulação, que constitui moléculas de IgE descomplexadas e, portanto, são capazes de sensibilizar mastócitos, basófilos e células dendríticas ligando-se ao receptor de alta afinidade à IgE (Hamilton, MacGlashan e Saini, 2010).

O tratamento com omalizumab anti-IgE, é indicado quando o paciente apresenta um nível de IgE total no soro, entre 30 e 700 kU / L, porém há relatos de maior eficácia da terapia com omalizumab tem sido pacientes que apresentam níveis totais de IgE acima de 75 kU/L. A terapia anti-IgE baseada em omalizumab (Xolair), é usada para ligar-se à IgE livre, para diminuir a IgE circulante, porém não se liga à IgE fixa nas células, porque o epítipo da IgE (fragmento específico) contra o qual o omalizumab é direcionado já está fixado nos receptores e, portanto, está oculto. Esta terapia é usada, principalmente, no tratamento de doenças brônquicas graves como asma e também para tratar a rinoconjuntivite alérgica. Atualmente, está sendo estudada a aplicação de omalizumab para o tratamento de alergias alimentares, mas o alto custo tem limitado o seu uso para esse fim (D'Amato, 2006b; Lanser *et al.*, 2015; Blank, Charles e Benhamou, 2016).

A média de vida do anticorpo monoclonal anti IgE (omalizumab) é relativamente curta, variando de 1 a 4 semanas, portanto há uma necessidade de administração repetida do medicamento, tornando um tratamento caro e pouco acessível. Dessa forma, a exigência de muitas doses e o alto custo caro desse medicamento limitam seu alcance de aplicação. Uma abordagem que pode suprimir persistentemente o nível de IgE a longo prazo com um único tratamento seria, portanto, altamente desejável (Ward, Dana E *et al.*, 2018).

### **1.6.5 – Uso de pequenos peptídeos**

Outra estratégia consiste no uso de pequeno peptídeos para marcar a IgE ou FcεRI para prevenir eventos adversos e a interação entre IgE e FcεRI. Para a IgE foram designados alguns peptídeos que se assemelham à região extracelular de interação com IgE da FcεRIα cadeia (Sandomenico *et al.*, 2009; Offermann *et al.*, 2012).

Sandomenico *et al.*, 2009 identificou os subdomínios do polipeptídeo envolvidos na ligação de IgE ao receptor de alta afinidade e demonstrou que os peptídeos que realizam a interação são capazes de deslocar a ligação da IgE ao receptor, confirmando a afinidade e especificidade desses ligantes e sugerindo uma potencial aplicação como moduladores de distúrbios associados com produção inadequada de IgE. Um estudo demonstrou que o peptídeo denominado D-PAM poderia se ligar especificamente a IgE e inibir a ativação dos mastócitos e evitar a anafilaxia em ratos. No entanto, o seu modo de ação foi questionado porque este componente não é capaz de impedir nem a ligação da IgE ao FcεRI, e nem a ligação do antígeno a IgE (Sandomenico *et al.*, 2009).

### **1.7 – Tratamento da alergia por bloqueio de IgE**

A proposta de bloqueio da interação do alérgeno e as IgEs presentes nos mastócitos, teve como ponto de partida a identificação dos seis epitopos alergênicos contínuos nas isoformas de albumina 2S de mamona, Ric c 1 e Ric c 3, onde são encontrados pelo menos dois resíduos de aminoácidos ácidos dicarboxílicos, o ácido aspártico e/ou o ácido glutâmico (Asp ou Glu) em suas sequências. Esta característica é responsável por promover uma interação entre as IgEs, pré-fixadas nos mastócitos, formando uma ligação cruzada entre as mesmas (Felix *et al.*, 2008, Deus de Oliveira *et al.*, 2011).

Ensaio *in vitro* foram realizados, nos quais os mastócitos foram sensibilizados com a IgE específica e posteriormente incubados com o ácido glutâmico livre. Na hipótese, a região variável da IgE fixada nos mastócitos seria bloqueada pelo ácido glutâmico, esses mastócitos sensibilizados com a IgE bloqueada pelo ácido glutâmico foram incubados com os alérgenos da mamona e verificou-se com isso a redução da desgranulação dos mastócitos (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011). Outra proposta foi a utilização de compostos derivados ou análogos ao ácido L-glutâmico livre como uma



abordagem alternativa que poderia atuar apenas como bloqueador de IgE, não sendo reconhecido pelas vias sinápticas no processo de neurotransmissão no SNC. Ensaios *in vitro* realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que dos cinco compostos análogos testados no bloqueio de IgE, um aminoácido foi identificado com possível ação bloqueadora: o ácido - N- (4nitrobenzoil)-L- glutâmico (Campos-Mesquita, 2016).

Dessa forma o bloqueio de IgE por compostos derivados de ácido glutâmico pode ser uma abordagem para o tratamento da alergia, porém ensaios pré-clínicos em animais modelos para alergia são necessários para validar esse método (Campos-Mesquita, 2016).

**Tabela III:**Resumo das estratégias para o tratamento de alergias.

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Anti-histamínicos</b>	- Alivia os sintomas alérgicos - Eficaz e seguro e fadiga	- Pode causar efeitos colaterais indesejáveis como: sonolência, sedação
<b>Imunoterapia alérgeno-específica</b>	- Dessensibilização alérgenos específicos - Diminui reações sintomáticas	- Funciona somente para os específicos
<b>Terapia Alérgeno não específica (anticorpos anti - IgE )</b>	Reduz as respostas alérgicas induzidas impedindo a ativação de mastócitos e consequentemente a liberação de alérgicos mediadores	- Não se liga à IgE fixa nos mastócitos - São necessárias muitas doses para o tratamento e apresenta um alto custo
<b>Bloqueador de IgE</b>	Bloqueio do sítio da IgE não envolvidos na interação com epítomos desenvolvimento	- Seu mecanismo ainda é totalmente conhecido - Método em alérgicos

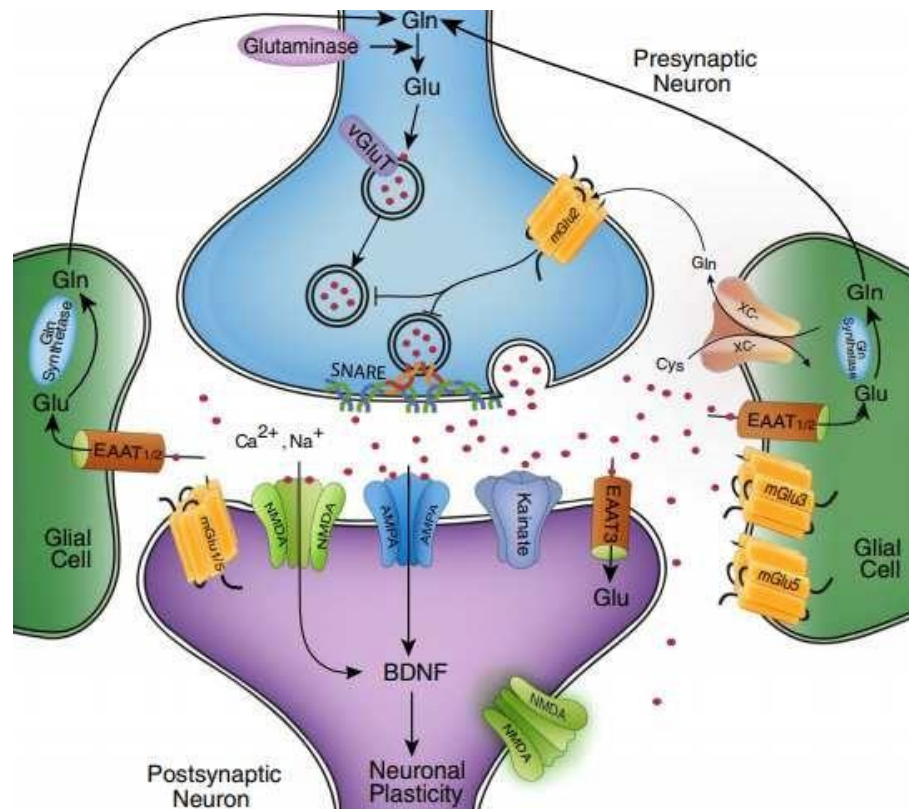
Apesar das vantagens atribuídas ao uso de bloqueadores de IgE como abordagem terapêutica para o tratamento da alergia, estudos sobre o mecanismo de ação e possíveis efeitos adversos são necessários (Ozdemir *et al.*, 2016).

### 1.8 – O ácido glutâmico e sua função neurológica

O glutamato (L-Glu) é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos (Figura 5) exercendo um papel importante em mecanismos subjacentes à plasticidade sináptica que fazem parte da base fisiológica de processos comportamentais como cognição e memória (Prybylowski e Wenthold, 2004). A síntese do glutamato ocorre a partir de glutamina, através da enzima glutaminase, e também pode ser sintetizado a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs, através da enzima GABA transaminase, que o converte em glutamato. Esse aminoácido encontra-se

amplamente distribuído no cérebro e demais regiões do SNC, sendo armazenado em vesículas sinápticas (Ruggiero *et al.*, 2011) .

O glutamato pode se ligar a dois grupos de receptores glutamatérgicos: os ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs podem ser de três tipos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA). Os receptores ionotrópicos (iGluR), apresentam ação rápida, pois afeta diretamente o fluxo de íons (principalmente Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>), gerando modificações no estado eletroquímico da membrana pós-sináptica. Enquanto os receptores metabotrópicos (mGluRs), precisam estar acoplados a proteína G e participam dos mecanismos de resposta intracelular através da ativação de segundos mensageiros. O efeito de excitação ou inibição induzido por essa forma de recepção indireta dos neurotransmissores pode gerar um fluxo mais lento e de maior duração (Jayanarayanan *et al.*, 2013; Ruggiero *et al.*, 2011).



**Figura 5: Esquema da neurotransmissão glutamatergica.** Neurônios liberam glutamato (Glu) na fenda sináptica, o qual interage com seus receptores de membrana (NMDA, AMPA, KA, e mGluR). A retirada do glutamato do espaço extracelular ocorre pela atividade dos transportadores de glutamato na membrana de astrócitos (EAAT1 e EAAT2) ou de neurônios (EAAT3). O sistema Xc contribui para a reciclagem do glutamato. Após a entrada do glutamato nos astrócitos, este pode ser convertido à glutamina (Gln), pela ação da glutamina sintetase, a qual, por sua vez, é exportada para o espaço extracelular onde pode ser captada pelos neurônios, onde é convertida a glutamato. Este pode ser vesiculado, através da atividade de vGLUT, para ser liberado de forma dependente de voltagem, pela interação vesicular com proteínas do complexo SNARE. NMDA-R, receptor N-metil D- aspartato; AMPA-R,  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico; KA, kainato; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; EAAT-1, transportador de aminoácido excitatório tipo 1. EAAT-2, transportador de aminoácido excitatório tipo 2; sistema Xc-, trocador de cistinaglutamato; vGLUT, transportadores vesiculares de glutamato; SNARE, proteína de ancoragem vesicular; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo (adaptado de Nicu, Kelmendi e Sanacora, 2012).

A investigação do uso do ácido glutâmico livre como agente bloqueador de IgE é uma proposta baseada nos resultados positivos obtidos através de ensaios *in vitro* (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011; Felix *et al.*, 2008). Associado a isso, o uso de um análogo deste aminoácido, o composto N-4 nitrobenzoiol foi também avaliado positivamente como uma abordagem terapêutica alternativa de bloqueio de IgE (Campos-Mesquita, 2016). Os efeitos do uso destes dois compostos, sobre o comportamento, efeito sobre

a potencialização do sono e da atividade locomotora, devem ser investigados, como parte das exigências referentes a um protótipo a fármaco para a liberação do uso destes compostos como medicamento para o tratamento de doenças alérgicas.

## **2. Objetivo Geral:**

Investigar o uso de agentes bloqueadores de IgE em teste *in vivo* como terapia para tratamento de doenças alérgicas.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Acompanhar a indução da resposta imune nos animais imunizados com Albumina 2S de mamona e alérgenos do leite de vaca

- Verificar se existe interferência do uso dos agentes bloqueadores nos testes *in vivo* para os sintomas alérgicos;
- Avaliar algumas alterações comportamentais nos animais submetidos aos compostos bloqueadores.

### **3- Material e Métodos**

#### **3.1- Obtenção de albumina 2S e ricina das sementes de mamona**

As albuminas 2S foram extraídas de sementes de *Ricinus communis* L. cultivar IAC-226 segundo a metodologia descrita por Thorpe et al. (1988), com adaptações propostas por Felix e colaboradores, em 2008. A ricina foi extraída e purificada conforme previamente descrito por (Meneguelli de Souza *et al.*, 2018). Inicialmente, a torta de mamona (500 g) foi embebida em 2,5 L de água destilada acidificada com HCl a um pH de 3,8 e foi agitada durante 6 h a 30 °C. Após a fase de sedimentação dos sólidos, o sobrenadante foi filtrado através de papel de filtro Whatman Nº 1. O precipitado foi ressuspenso em 1,5 L de água destilada (sem HCl), agitada por 3 h e filtrada novamente. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Este filtrado, aproximadamente 5L contendo toda a ricina e um pouco de ricinina, foi evaporada para 300 mL em uma centrífuga a vácuo (Christ, Wertheim, Alemanha). O filtrado foi saturado com cloreto de sódio e centrifugado a 2.000 g durante 20 min para precipitar a ricina. O precipitado foi dissolvido em 200 mL de solução desionizada e precipitado novamente com sulfato de amônio (90% de saturação). Depois da precipitação por

mais duas vezes com o mesmo sal, o precipitado foi dissolvido em 200 mL de água e dialisado a 4 °C durante 72 h com tampão Tris, pH 6,8. O tampão de troca foi preparado a cada 2 horas durante as primeiras 12 horas e, posteriormente, a cada 6 horas para o restante da diálise. Após 72 h, o dialisado foi centrifugado a 2.000g por 10 min para separar a matéria insolúvel do sobrenadante contendo a ricina. A solução foi concentrada a vácuo.

O “pool” de albumina 2S das sementes de mamona foram obtidos após as seguintes etapas de extração: as proteínas passaram por um processo de solubilização em tampão fosfato pH 7,0, e precipitação com sulfato de amônio. As sementes (100 g) de *R. communis*, após retirada do tegumento, foram maceradas, e os lipídeos extraídos com 150 mL de hexano. Após agitação por duas horas o material foi centrifugado por 10 minutos a 3000 x g. O sobrenadante foi descartado e o procedimento de extração repetido até que não se observasse mais a presença de lipídeos (2 ou 3 vezes). Ao sedimento, isento de gorduras, foi adicionado 100 mL de tampão fosfato 1M, pH 7,0 e a mistura foi mantida sob agitação por 1 hora a 4 °C, e em repouso por 2 horas. O homogenato obtido foi novamente centrifugado a 3000 x g, por 15 minutos, o sedimento foi descartado, ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até atingir a saturação de 90 % com agitação posterior por 1 hora. O material foi armazenado por 18 h a 4 °C e após este período, a suspensão foi centrifugada a 3000 x g, por 20 minutos, e o sobrenadante foi descartado. A suspensão obtida foi então centrifugada por 5 minutos a 4100 x g e o sobrenadante obtido, rico em proteínas, foi utilizado para purificação das albuminas 2S e obtenção da fração contendo a ricina.

A etapa de purificação das proteínas, foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-50). Por esta metodologia, separa-se uma fração rica em ricina, outra em albuminas 2S e uma com peptídeos de menor massa molecular. Utilizou-se como fase móvel ácido trifluoracético (TFA) 0,1% num fluxo de 1,0 mL/min e, frações de 1 mL foram coletadas e detectadas a 280 nm no espectrofotômetro (T70 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd). O material proveniente da cromatografia de exclusão molecular foi purificado por cromatografia de fase reversa em coluna C18, sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography) da Shimadzu®, modelo LC-10AD. A cromatografia foi desenvolvida num fluxo de 0,7 mL/min, usando TFA 0,1% como solvente A e acetonitrila 80% contendo TFA a 0,1% como solvente B, com gradiente de eluição foi de 0-80% de solvente B durante 55 min. O perfil de eluição foi monitorado por medição da absorvância a 220 nm. Os espectros de UV (ultravioleta) foram obtidos utilizando um foto-diodo detector e as frações que continham os

principais picos foram reunidas num sistema speed-Vac. As proteínas deste material foram determinadas pelo método do ácido bicinrônico (BCA) (Smith *et al.*, 1985) e foram liofilizadas e guardadas a -20°C, em pequenas alíquotas.

### 3.2 – Experimentação animal:

Utilizou-se camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idade entre seis e oito semanas, os quais foram adquiridos do Biotério central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Todos os experimentos com animais (protocolo nº 297) foram aprovados e autorizados pelo CEUA/UENF (Comissão de Ética de Uso Animal/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro) anexo 1. Os camundongos foram mantidos em instalações apropriadas de cuidados com animais convencionais, separados em grupos de 4 a 6 animais em caixas de polipropileno tampadas com grade de aço inoxidável nas dimensões 49 cm X 32 cm X 17 cm forradas com maravalha (Figura 7). Receberam água filtrada fornecida em garrafas de vidro com bico de aço inoxidável acopladas às tampas das caixas e ração Nuvilab® ad libitum (a vontade), exceto nos dias dos experimentos pelo tempo exigido pelo protocolo. A maravalha e a água foram trocadas duas vezes por semana e a reposição de ração foi feita sempre que necessário (Taborda, Mehnert e Silva, 2004; CNCA, 2013).



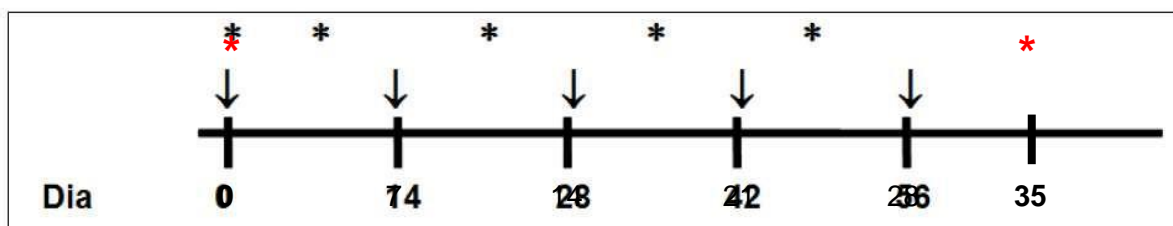
**Figura 6:** Caixas dormitório para manutenção dos animais Fonte: arquivo pessoal.

#### 3.2.1- Protocolos de imunizações

Etapas de imunizações foram iniciadas para obtenção de soro imune antialbumina 2S, em colaboração com a Dr<sup>a</sup> Giliane da Silva de Souza Cabral, sob supervisão da Dr<sup>a</sup>. Elena Lassunskaja do Laboratório de Biologia do Reconhecer da



UENF. Ao todo dois protocolos diferentes de imunização foram empregados no mesmo modelo animal, BALB /c (6 fêmeas de 5 a 6 semanas). A escolha dos camundongos BALB /c, foi devido à ampla utilização desses animais, em diversos estudos, para o desenvolvimento de modelos de alergia obtendo respostas positivas para produção de IgE específica após exposição intraperitoneal à ovalbumina (OVA). Esse modelo animal também foi utilizado para sensibilização contra alérgenos como proteínas do soro de leite e nozes (Chen *et al.*, 2013; Moronta *et al.*, 2016). Utilizou-se, dois protocolos de imunização, no primeiro protocolo de imunização, camundongos BALB/c fêmeas de 6 semanas de idade foram sensibilizados com 1 e 10 µg de com albumina 2S de mamona e 4 mg de hidróxido de alumínio (4 mg /mL) como adjuvante. As amostras foram injetadas (200 µl/inoculação) por via intraperitoneal, sendo ao todo cinco imunizações nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, respectivamente (Figura 8). Após a terceira imunização (dia 21), os animais receberam um reforço do antígeno nas mesmas concentrações (1 e 10 µg) na presença de 2,5 mg de gel de hidróxido de alumínio (4 mg / mL), e esse procedimento foi repetido no dia 28 sem adjuvante usando apenas a proteína albumina 2S nas concentrações descritas acima. O soro pré-imune, foi coletado no (dia 0) e sete dias após a última imunização (dia 35). Para realização deste procedimento os camundongos foram anestesiados com ANESTALCON® 5,0 mg / mL (cloridrato de Proximetil a 0,5%) minutos antes da coleta de sangue pelo plexo retro-orbital. As amostras foram armazenadas em freezer a -20C°.



**Figura 7:** Cronograma do protocolo experimental de imunização. As setas representam as imunizações, e os asteriscos as coletas de sangue.

### 3.3 - Detecção de imunoglobulinas séricas por ELISA

As placas de 96 poços de poliestireno (Nunc-Immuno Plate IF) foram revestidas com albumina 2S purificada a 60 µL/poço (1 µg/µL em tampão de carbonato de sódio-bicarbonato de sódio 50 mM pH 9,6) a 4 ° C durante a noite. Após lavagem com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas com

PBS-T contendo gelatina a 1% por uma hora à temperatura ambiente, lavadas com PBS-T. Lavado com PBS-T e incubado com amostras de soro obtidas dos camundongos, diluídas em gelatina PBS-T a 0,1% a 37 °C por uma hora, na proporção 1:5 para IgE e 1:500 para IgG1. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS-T e tratados com anticorpos anti-IgE ou IgG ou IgG1 de camundongos, conjugados com peroxidase (Southern Biotech) (diluídos de acordo com as instruções do fabricante) em gelatina PBS-T 0,1% por uma hora a 37 °C. Foi adicionada uma solução de substrato de o-fenilenodiamina (OPD) peroxidase (Sigma) e o desenvolvimento da cor por 15 minutos. A reação foi parada com ácido sulfúrico 3M, e a intensidade colorimétrica foi medida por absorbância 492 nm, utilizando um Microplate Reader (Thermo Plate).

### **3.4 – Ensaio de desgranulação de mastócitos e reação cruzada**

Para investigar a reatividade cruzada entre o soro imune anti-albumina 2S e outros alérgenos, empregamos ensaio de desgranulação de mastócitos obtidos de lavado peritoneal de ratos Wistar, o qual foi avaliado por análise da morfologia celular por microscopia óptica, segundo metodologia descrita por Felix *et al.*, 2008. Os ratos Wistar (250 g), criados no Biotério da Universidade Estadual do Norte Fluminense, foram sacrificados com CO<sup>2</sup> e a lavagem peritoneal realizada com a injeção de 20 mL de DMEM (Gibco) contendo 12 U/ mL de heparina. O abdômen foi suavemente massageado por cerca de 90s. A cavidade peritoneal foi cuidadosamente aberta e o fluido contendo células peritoneais foi coletado com uma pipeta Pasteur. Depois disso, as células foram transferidas para Placas de Petri e incubadas por 30 minutos a 37 °C. Dois terços da camada superior foi aspirada e descartada. O sobrenadante enriquecido com mastócitos (1,8 x 10<sup>5</sup> mastócitos/mL) foi separado em alíquotas de 100 mL em tubos eppendorf. Mastócitos (100 mL) foram incubados com soro pré-imune de rato, como controle e, foram inicialmente ativados por 60 minutos a 37 °C usando soro policlonal anti-albumina 2S produzido em rato. Depois da sensibilização com IgE, as células foram lavadas duas vezes com DMEM. Cada um desses experimentos foi realizado na presença ou ausência do pool de albumina 2S (100 ng). Em seguida, as células foram coradas por 15 minutos com 10 mL de uma solução contendo 0,1% de azul de toluidina, 10% de formaldeído e ácido acético a 1%, pH 2,8, permitindo a visualização dos mastócitos desgranulados. Mastócitos granulosos e desgranulados foram contados sob um microscópio de luz usando a objetiva de

40X em uma câmara Neubauer. Para investigar a reatividade cruzada entre a albumina 2S de *R. communis* e alérgenos usados para diagnóstico de alergia, os mastócitos foram previamente sensibilizados por IgE anti-albumina 2S e em seguida, foram incubados com aeroalérgenos (FDAPRICKIT lote 04AK00001) ou alimentares (FDA-FOOD KIT lote 04AK00004). Os alérgenos aéreos testados foram os da poeira doméstica, gramíneas e tabaco. Os alérgenos alimentares foram de amendoim, milho e peixe. A quantificação de proteína das soluções de alérgenos do kit FDA foram realizadas usando o método de Bradford usando ovoalbumina como padrão. Soluções estoque contendo 10 mg/mL foram preparadas e em cada teste utilizou-se 10 mL dessas soluções alergênicas. A ativação dos mastócitos foi avaliada pela porcentagem de células granuladas e desgranuladas.

A reatividade cruzada também foi avaliada por ELISA, as placas foram previamente sensibilizadas com 60 µg dos respectivos alérgenos, ambas as soluções contendo solução (10 mg/mL). A placa previamente sensibilizada com os alérgenos, foi incubada com o soro imune de camundongo anti-albumina 2S (etapa do anticorpo primário) e , posteriormente, foi incubada com os anticorpos anti-IgE de camundongo conjugado com peroxidase (Southern Biotech). Após a etapa de revelação, a intensidade colorimétrica foi detectada por absorvância 492 nm, utilizando um Microplate Reader (Thermo Plate).

#### **3.4.1 – Ensaio de bloqueio de IgE**

Além do teste de reação cruzada, realizou-se também o ensaio de bloqueio de IgE para albumina 2S de mamona e os demais alérgenos testados, conforme descrito anteriormente. O soro imune de camundongo foi pré-incubado por 1h com ácido glutâmico (concentração final de 10 µg/ mL).As etapas realizadas para quantificar perfil de bloqueio de IgE, seguindo as etapas gerais previamente descritas no item 3.3. A porcentagem de bloqueio da ligação a IgE foi definida através da fórmula:  $(A-B) \times 100/A$ , onde A e B são os valores das absorvâncias do controle (sem tratamento) e amostra tratada, respectivamente.

#### **3.5 - Sensibilização dos Camundongos por via oral**

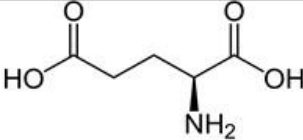
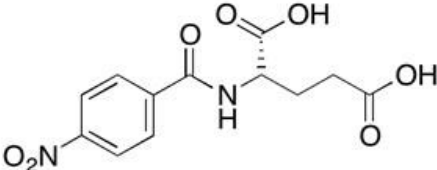
Camundongos Balb/C foram sensibilizados conforme previamente descrito (Smaldini *et al.*, 2014). Os ensaios de sensibilização e tratamento dos animais

foram feitos em colaboração com Dr. Guillermo Docena e Dr<sup>a</sup> Paola L. Smaldini do Laboratorio do Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (Universidade Nacional de La Plata, UNLP, Argentina). No total dez animais receberam seis doses intragástricas semanais (i.g.) de 20 mg de Proteínas do Leite de Vaca (PLV), obtida comercialmente como leite em pó desnatado, mais 10 µg de toxina do cólera (TC) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) homogeneizados em um volume final de 200 µL de tampão bicarbonato. Adicionalmente, outros dois protocolos de sensibilização foram empregados, o primeiro utilizando PLV e no segundo utilizou-se “pool” de Albuminas 2S de mamona. A ricina, obtida das sementes de mamona, foi utilizada em ambos os protocolos para verificar a sua função como adjuvante. A metodologia foi adaptada de Adel-Patient et al., 2005; Li *et al.*, 1999 e Menezes *et al.*, 2012, para este ensaio foram utilizados camundongos machos BALB/c com idade entre 4 e 6 semanas, foram administrados por via gástrica, através de gavagem, 20 mg de PLV (n=5) e 4 mg de albumina 2S com 0,04 µg de Ricina (n= 5) nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35. No dia 45, foi realizado o desafio oral (DO) com 10 mg PLV e albuminas 2S, sem adjuvante, nos grupos de animais imunizados.

### 3.5.1 – Tratamento com os aminoácidos livres

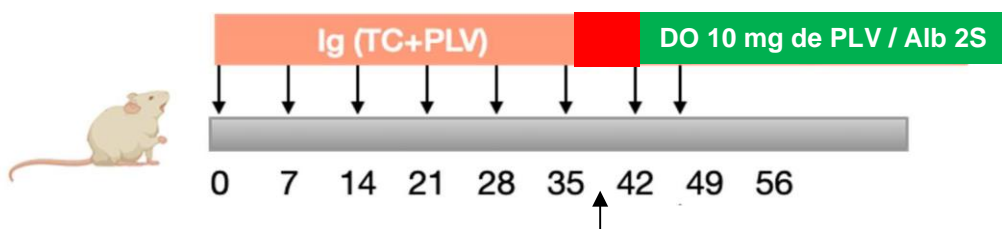
Para avaliar o tratamento dos animais sensibilizados, foram utilizados os aminoácidos livres que apresentaram melhor desempenho nos ensaios de “bloqueio de IgE” *in vitro*, previamente descrito por Deus-de-Oliveira (2011) e Campos-Mesquita (2016), sendo os ácido L-glutâmico e o N-(4-Nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico e suas respectivas estruturas apresentadas na tabela IV, estes aminoácidos foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich.

**Tabela IV:** : Relação dos compostos que serão utilizados nos ensaios de bloqueio.

Ácidos glutâmicos Modificados	Sigla	Fórmula Estrutural	Massa Molecular
Ácido L-glutâmico	(E) (AG)		147.13
N-(4-Nitrobenzoil) L-ácido glutâmico	(AGN)		305.24

Para seleção das possíveis doses terapêuticas, tendo em vista a proposta de bloqueio de IgE específica, utilizamos o cálculo da dose a ser administrada baseado na concentração sérica total de IgE e o peso corporal do animal. No entanto, administramos a dose em excesso molar aos níveis circulantes de IgE (Ward, Dana E. *et al.*, 2018).

Após sete dias da última imunização, os animais já sensibilizados (n=5), contra os alérgenos do leite (PLV), receberam 10 ou 30 mg/Kg dos aminoácidos (ácido L-glutâmico (E) e N-(4-Nitrobenzoil) L-ácido glutâmico (E4), respectivamente, pela via intraperitoneal trinta minutos antes do desafio oral. O grupo controle (n=5) recebeu apenas PBS. Antes da administração oral, os camundongos foram submetidos a jejum (1 h) e foi administrada uma solução de bicarbonato de amônio 0,140 M para reduzir a acidez gástrica (30 min). Os animais foram desafiados oralmente com 20 mg de PLV e os sintomas foram avaliados por dois pesquisadores de forma independente e aleatória. Amostras de sangue foram coletadas durante todo o protocolo e os soros foram armazenados a -20 °C para análises futuras.



**Figura 8:** Desenho esquemático do protocolo experimental em camundongos Balb/c (n = 5/ grupo). Ig: administração intragástrica; PLV: proteínas do leite de vaca; TC: toxina de cólera, DO: desafio oral. As setas indicam os dias em que os animais receberam as doses de cada imunização.

### 3.5.2 - Avaliação in vivo de sinais clínicos da reação alérgica

Foram observados sintomas entre 30 e 60 minutos após a administração oral. Realizou-se a avaliação de forma cega por dois pesquisadores independentes. Os escores clínicos foram atribuídos de acordo com o seguinte intervalo: 0 = sem sintomas; 1 = coçar e esfregar ao redor do nariz e cabeça; 2 = inchaço ao redor dos olhos e boca, diarreia, piloereção, atividade reduzida e / ou atividade reduzida com aumento da frequência respiratória; 3 = chiado, cianose ao redor a boca e a cauda; 4 = nenhuma atividade após estímulo ou tremor e convulsão; e 5 = morte (Quadro 1).

Pontos	Sinais clínicos observados
0	Sem sintomas
1	Coçar e esfregar ao redor do nariz e cabeça
2	Inchaço ao redor dos olhos e boca, diarreia, piloereção, atividade reduzida e /ou atividade reduzida com aumento da frequência respiratória
3	Respiração dificultosa, chiado, cianose ao redor a boca e a cauda
4	Inatividade, convulsão
5	Morte

**Quadro 1:** Descrição dos sinais clínicos observados no modelo animal para alergia alimentar (adaptado de Smaldini *et al.*, 2014)

### 3.5.3 - Teste cutâneo

Para verificar se o tratamento dos animais com os aminoácidos reduziria os sintomas alérgicos, o teste cutâneo foi proposto, seguindo protocolo previamente descrito por (Smaldini *et al.*, 2014). Neste experimento, os camundongos receberam injeção intradérmica com 20 µg de PLV em 20 µl de solução salina estéril um das patas e na outra pata contralateral receberam apenas solução salina (controle negativo) e, posteriormente foram injetados por via intravenosa (iv) com 100 µL de 0,1% de corante azul de Evan (Anedra, Buenos Aires, Argentina). Os animais foram divididos em

grupos: tratados com os agentes bloqueadores de IgE (item 3.6.1) e não tratados. Nesse sentido, os camundongos sensibilizados receberam as doses de 10 e 30 mg/kg por via intraperitoneal trinta minutos antes de iniciar o teste cutâneo.

### **3.6 – Avaliação comportamental**

Para caracterização da existência de ação depressora ou estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) desencadeada pelos aminoácidos usados como agentes bloqueadores de IgE, de forma aguda, foram realizados os testes de ambulação/movimentação espontânea e de potencialização do tempo de sono induzido por barbitúrico. Os experimentos comportamentais foram realizados em colaboração com o Dr. Arthur Giraldi Guimarães, do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/UENF) e Dr<sup>a</sup> Marinete Pinheiro Carrera, do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA/UENF).

#### **3.6.1 - Teste de potencialização do tempo de sono**

Este teste investiga se os aminoácidos nas doses terapêuticas propostas, possuem um efeito depressor sobre o SNC prolongando o tempo de sono dos animais por efeito somatório com outra droga depressora (ALMEIDA, 2006). Neste protocolo os animais foram divididos entre oito grupos experimentais contendo seis animais em cada grupo que receberam um dos tratamentos a seguir: ácido Lglutâmico (AG) e N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico (AGN) nas doses de 10, 30 e 50 mg / kg (ip), enquanto o grupo controle positivo foi tratado com diazepam (5 mg/kg; ip) e grupo controle negativo com veículo (0,9% solução salina fisiológica; ip), 0,2 ml/kg administrados por via intraperitoneal (Ip). Trinta minutos depois, tiopental sódico (40 mg / kg; i.p.) foi administrado a cada camundongo para induzir o sono. Imediatamente após a aplicação do tiopental o cronômetro foi acionado e o animal foi colocado sozinho em uma bandeja de polipropileno previamente higienizada com álcool 70%. O animal foi observado até ficar cambaleante ou imóvel, então foi colocado na posição de decúbito dorsal até perder seu reflexo de endireitamento, ou seja, quando perdesse a capacidade de voltar para a posição natural colocando as 4 patas no fundo da bandeja. O animal foi observado até que recuperasse o reflexo de endireitamento por 3 vezes consecutivas, quando foi considerado o tempo final do sono. Sendo assim o tempo de latência para o início do sono foi considerado o tempo entre a aplicação do tiopental sódico e a perda do reflexo de endireitamento e o tempo total de duração do

sono foi considerado o tempo entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento (ALMEIDA, 2006).

Durante todo o tempo de aplicação dos testes os animais foram diretamente observados e fixou-se um tempo máximo de observação de 3 horas de sono para cada animal, quando o animal não acordou dentro deste período foi considerado que dormiu por 3 horas.

### **3.6.2 - Teste de coordenação motora (*Rota rod*)**

A avaliação do efeito sobre a coordenação motora foi feita usando um aparelho Rotarod (Rotarod EFF 411, Insight®), como mostrado na Figura 10. Os animais foram submetidos a um período de treinamento para habituação no aparelho dois dias antes do experimento. Apenas os animais que demonstraram capacidade de permanecer na haste rotativa foram utilizados para o teste. No dia do experimento, os grupos de teste receberam os tratamentos AG e AGN nas doses de 10, 30 e 50 mg / kg (i.p.), enquanto o grupo controle recebeu veículo 0,2 ml/kg (solução salina fisiológica a 0,9%; i.p.). O outro grupo controle recebeu diazepam (5 mg/kg; i.p.). Trinta minutos após a administração dos medicamentos, cada camundongo foi colocado na haste rotativa (velocidade de rotação de 20 RPM) durante cinco minutos (300s). O tempo gasto no aparelho foi observado por 5 minutos de duração (300 s).



**Figura 9:** Aparelho rota-rod para teste de locomoção. Fonte: arquivo pessoal.

### **3.6.3 – Teste de movimentação espontânea (Campo aberto)**

O teste utilizando o campo aberto como objetivo principal avaliar a locomoção ou a reatividade emocional dos animais tratados com a substância de interesse nesse estudo. O ambiente experimental consistiu em uma sala contendo uma arena quadrada medindo 40x40x40 cm, onde foi utilizado apenas uma luz vermelha voltada



para a arena. Para o registro do comportamento locomotor, foram utilizadas câmeras (IIKEGAMI, modelo ICD – 49 e Panasonic, modelo WV – BP334), posicionadas 60 cm acima das arenas experimentais (Figura 11).

Os registros em formato de vídeos feitos durante o experimento foram analisados através de um computador PC compatível, contendo um programa de análise de imagens, EthoVision (NOLDUS, Holanda), cujo o sistema quantificará a atividade locomotora em distância percorrida (metros).

Os experimentos foram conduzidos segundo o protocolo experimental de Carrera e colaboradores (2013), com modificações. O procedimento experimental foi constituído das seguintes fases:

**a) Fase de Habituação (1-3 dias):** Os animais receberam 0,2 ml de solução salina (NaCl 0,9%) e retornaram para a gaiola-viveiro e 30 minutos após a administração foram colocados na arena experimental por 15 minutos onde a locomoção foi registrada. A fase de habituação foi realizada durante 3 dias consecutivos.

**b) Teste de locomoção (1 dia):** No dia seguinte ao término da fase de habituação, os animais foram divididos nos grupos experimentais, os quais receberam os seus respectivos tratamentos farmacológicos AG e AGN nas doses de 10, 30 e 50 mg / kg (i.p.), enquanto os grupos controles receberam veículo (solução salina fisiológica a 0,9%; i.p.) e Diazepam (5 mg/kg; i.p.). Após administração dos medicamentos os camundongos retornaram para a gaiola-viveiro por 30 minutos e em seguida o animal foi posicionado no centro da arena experimental (campo aberto) por 15 minutos onde a locomoção foi registrada, para posterior observação sistemática pelo pesquisador.



**Figura 10:** Arena utilizada no teste de movimentação espontânea. Fonte: arquivo pessoal.

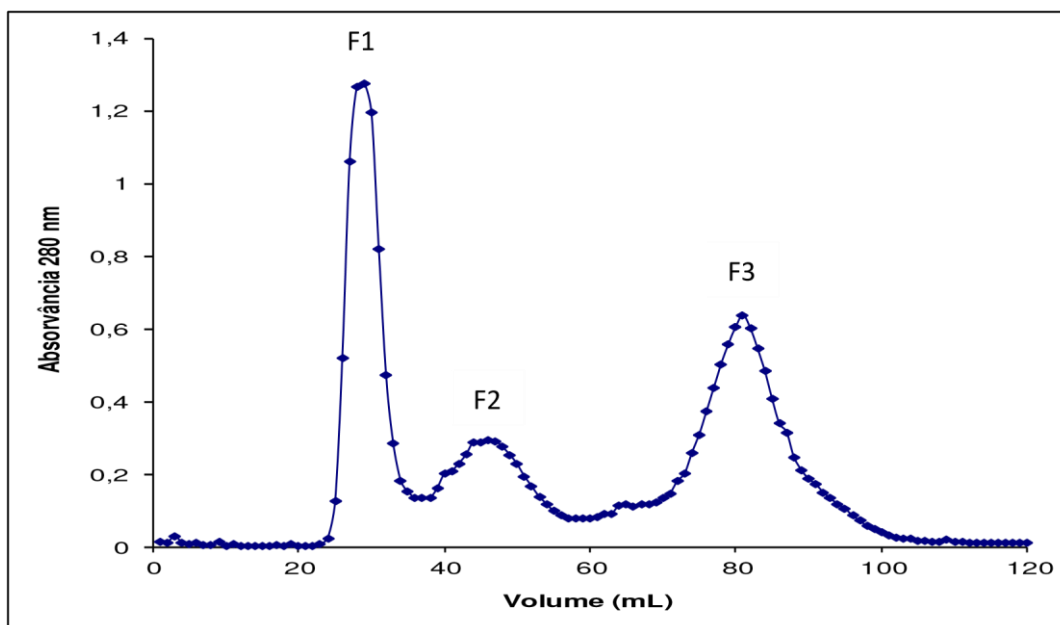
### **3.6.4 – Análise Estatística**

Os resultados dos testes comportamentais foram analisados utilizando a Análise de Variância (ANOVA) de um fator. Para a análise da fase de tratamento farmacológico (fase de Indução), foi utilizada ANOVA de dois fatores, sendo os dias de administração usados como componentes dentro do grupo, enquanto que os grupos experimentais foram utilizados como componentes entre todos os grupos. Nas análises onde foram obtidos valores de F de acordo com os critérios estatísticos de  $p < 0,05$ , as possíveis diferenças entre os grupos foram testadas através do teste de comparações múltiplas de Duncan.

## **4. Resultados**

### **4.1- Purificação de albuminas 2S de sementes:**

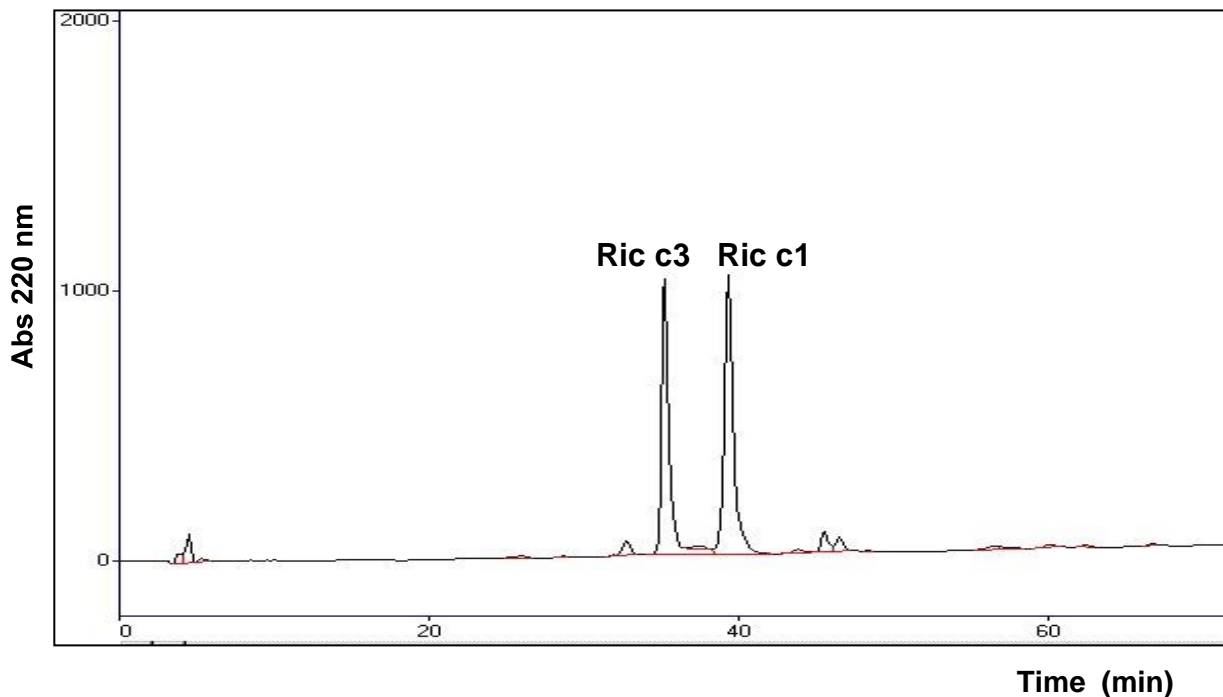
O perfil cromatográfico para o fracionamento do extrato bruto obtido de sementes de *R. communis* e fracionado por cromatografia de gel filtração (Sephadex G-50 é mostrado na Figura 12 três frações bem resolvidos, denominados F1, F2 e F3 foram obtidos.



**Figura 11:** Perfil cromatográfico da cromatografia líquida de exclusão molecular (Sephadex G-50) do extrato bruto de sementes de mamona; coluna (50 x 1.5 cm). Eluente: Ácido Trifluoracético 0,1%; Fluxo: 1mL/min. F1: Fração peso molecular >30.000 Da; F2: Fração de peso molecular entre 3.000 e 30.000 da; F3: Fração de baixo peso molecular (<3.000 da).

A fração F2, região prevista para eluição da albuminas 2S (massa molecular entre 10 a 18 KDa), foi agrupada e posteriormente submetida a etapa de purificação. O perfil cromatográfico da repurificação desta fração em coluna C18/HPLC é apresentado na Figura 13. Dois picos majoritários, foram visualizados e de acordo com caracterizações prévias (Silva *et al.*, 1996) correspondem aos alérgenos Ric c1 e Ric c3.

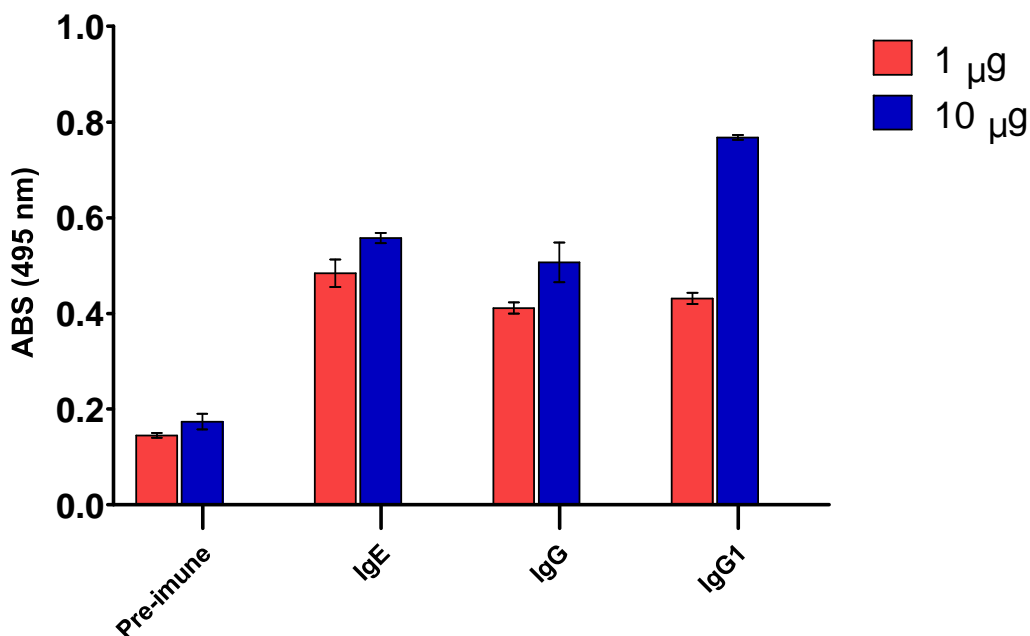
Das frações proteicas obtidas da cromatografia das sementes, a fração F2, região prevista o perfil cromatográfico das albuminas 2S com massa molecular (10 a 18 KDa), foi agrupada e posteriormente submetida a etapa de purificação. A purificação das frações F2 obtidas a partir da cromatografia líquida de exclusão molecular realizada a partir de extratos brutos de sementes de mamona foi realizada utilizando a cromatografia de fase reversa em coluna C18, sistema HPLC.



**Figura 12:** Perfil cromatográfico da albumina 2S (Ric c 3 e Ric c 1) de mamona após cromatografia de fase reversa em coluna C-18, sistema HPLC (Pharmacia Biotech C18 5 u 4,6 X 250 mm). Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluor-acético (TFA) 0,1% (solução A), e acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O fluxo de eluição empregado foi de 0,7 mL/min, e o gradiente utilizado foi: 10 minutos de solução A; de 0 a 80% de solução B de 10 a 40 minutos; nos 5 minutos finais com solução A.

#### 4.2 – Detecção de imunoglobulinas nos soros policlonais

O perfil de imunoglobulinas do soro policlonal obtido após a imunização de camundongos Balb/c com o pool das albumina 2S (Ric c 1 + Ric c 3), foi quantificado através do teste ELISA, e o resultado é apresentado na Figura 14. A presença de IgG1 e IgE caracteriza o padrão de resposta humoral induzido pelos linfócitos Th2.



**Figura 13:** Detecção de imunoglobulinas no soro de camundongos sensibilizados com albumina 2S, 1 e 10 µg / 200 µL. Anticorpo primário: 1:5 (IgE); 1: 500 (IgG e IgG1). Anticorpos secundários: 1: 2000 (anti-IgE); 1: 5000 (anti-IgG e IgG1). As médias dos valores de absorvância obtidos dos soros dos seis animais por grupo são mostradas.

Verificamos que os níveis de cada imunoglobulina foram ligeiramente maiores quando a imunização foi realizada com 10 µg de proteína em comparação com imunizações com 1 µg e que os níveis das imunoglobulinas associadas à uma resposta Th2, IgG1 e IgE foram elevados.

#### 4.2 – Ensaio de reatividade cruzada e bloqueio com ácido glutâmico

A Tabela IV apresenta a reatividade cruzada entre os componentes alergênicos, presentes nos kits FDA-Allergenic, e o soro anti-Ibumina 2S de mamona.

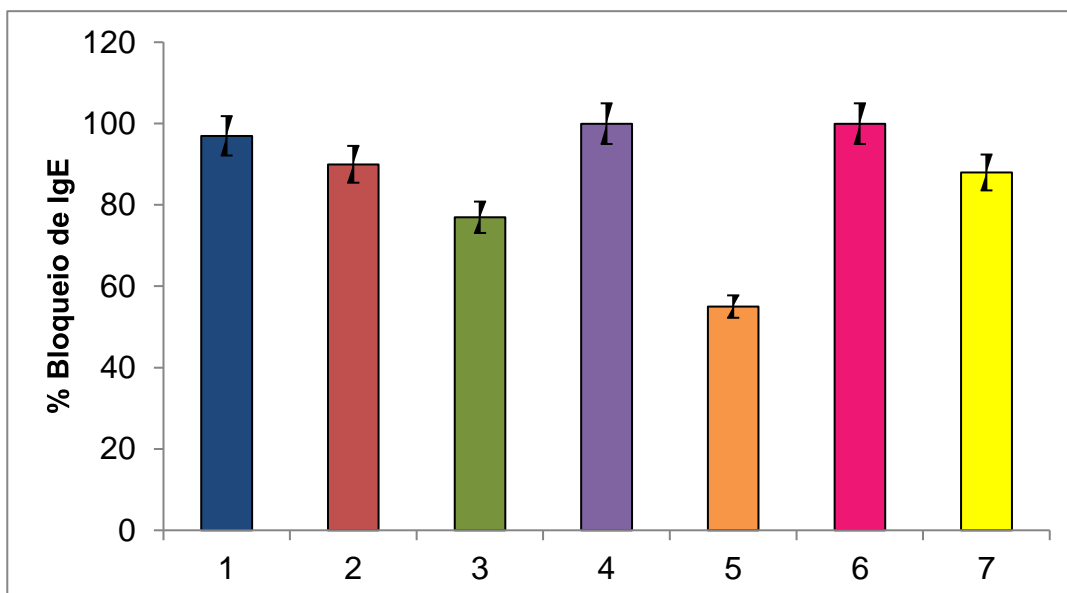
**Tabela IV:** Porcentagem de degranulação dos mastócitos de rato desencadeada por reação cruzada entre albumina 2S de *Ricinus communis* L. e alérgenos alimentares ou aeroalérgenos.

Amostras	Desgranulação na ausência total do soro (±SD)	Desgranulação na presença total do soro (±SD)

Controle negativo	27.6 ( $\pm 1.2$ )	30.0 ( $\pm 1.0$ )
Albumina 2S	32.6 ( $\pm 1.3$ )	70.0 ( $\pm 1.0$ )
Poeira doméstica	36.7 ( $\pm 0.2$ )	51.4 ( $\pm 0.4$ )
Gramíneas	38.8 ( $\pm 0.2$ )	56.0 ( $\pm 0.9$ )
Tabaco	34.8 ( $\pm 0.2$ )	55.0 ( $\pm 0.9$ )
Amendoim	30.2 ( $\pm 0.3$ )	51.4 ( $\pm 0.3$ )
Milho	34.4 ( $\pm 1.0$ )	54.4 ( $\pm 1.5$ )
Peixe	38.8 ( $\pm 1.0$ )	57.6 ( $\pm 0.3$ )

Podemos observar que os mastócitos sensibilizados, ao serem incubados com alérgenos de diferentes fontes como: poeira doméstica, gramíneas, tabaco, amendoim, milho e peixe, dos apresentaram perfil de desgranulação acima de 40% na presença do soro anti-albumina 2S de mamona indicando reatividade cruzada entre eles.

A figura 15 apresenta o percentual de bloqueio da reatividade cruzada quando o soro anti albuminas 2S de mamona foi incubado com ácido glutâmico.



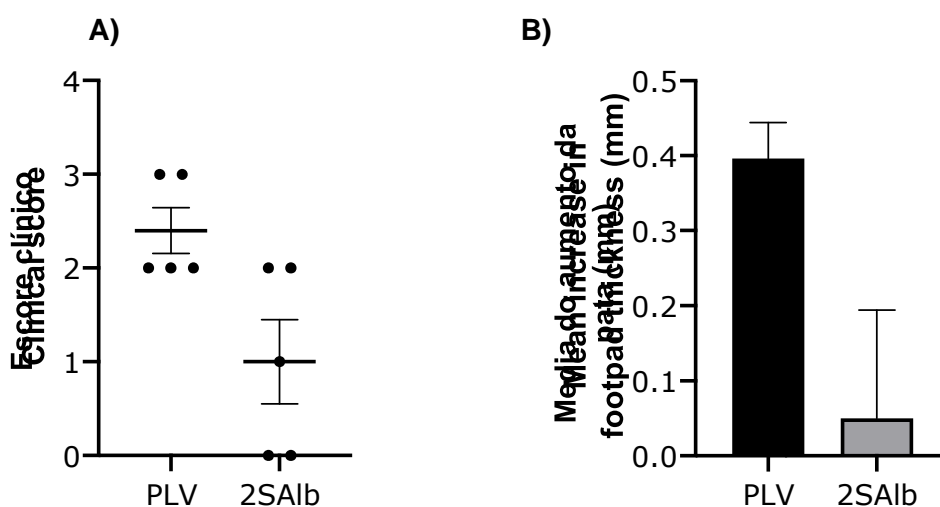
**Figura 14:** Ensaio imuno-enzimático de bloqueio da ligação de IgE aos alérgenos. 1. albumina 2S 2. alérgenos de poeira doméstica, 3. gramíneas, 4.tabaco,5.amendoim, 6. milho e 7. Peixe. O soro imune 2S anti-albumina diluído (1:5) foi tratado com ácido L-glutâmico antes do ensaio imune. Sensibilização da microplaca com

10 µg/mL dos alérgenos. Anticorpo secundário: anti-IgE (1:2000). Os valores médios de 3 ensaios ± DP são apresentados.

A partir dos dados apresentados na figura 15 podemos inferir que a préincubação do soro com ácido glutâmico reduziu a reatividade da IgE com a albumina 2S e os demais epitopos ligantes de IgE semelhantes presentes em todos os outros alérgenos testados. Os resultados indicam um percentual de bloqueio da ligação de IgE aos alérgenos, confirmando que o grupo carboxila desses aminoácidos pode ser significativo nas interações entre o epítipo alergênico reconhecido pela IgE. Foram observados bloqueios de 90% para alérgenos da poeira e 100% para tabaco e peixe. Neste ensaio, bloqueios inferiores foram observados para gramíneas e amendoim (Figura 15).

### 4.3 – Respostas in vivo da administração oral de PLV e albumina 2S

Para o estudo da capacidade das albuminas 2S de provocar reações alérgicas e a participação da proteína ricina como adjuvante, utilizamos o modelo animal para alergia alimentar às Proteínas do Leite de Vaca (PLV). Dessa forma, foi realizado um desafio oral após a etapa sensibilização para evidenciar a indução de reações de hipersensibilidade imediatamente após a exposição ao alérgeno e os sinais clínicos foram pontuados (Figura 16-A).



**Figura 15:** Respostas in vivo do modelo animal para alergia alimentar. (A) Escores clínicos: 0 = sem sintomas; 1 = coçar e esfregar ao redor do nariz e cabeça; 2 = inchaço ao redor dos

olhos e boca, diarreia, piloereção, atividade reduzida e / ou atividade reduzida com aumento da frequência respiratória; 3 = chiado, cianose ao redor a boca e a cauda; 4 = nenhuma atividade após estímulo ou tremor e convulsão; e 5 = morte, correspondentes aos sintomas desencadeados após os desafios orais com 10 mg proteínas do leite (PLV) ou 4 mg de albumina 2S de mamona, ambos utilizando ricina como adjuvante. (B) Inchaço da pata quantificado em mm. Os dados são expressos como os valores médios  $\pm$  SEM.

Nesse resultado, observamos que os animais sensibilizados com PLV apresentaram leves sintomas clínicos como inchaço ao redor dos olhos e boca, já os animais que receberam o “pool” de albumina 2S de mamona apresentaram menos escore clínico. Em ambos os protocolos de imunização utilizou-se a ricina como adjuvante.

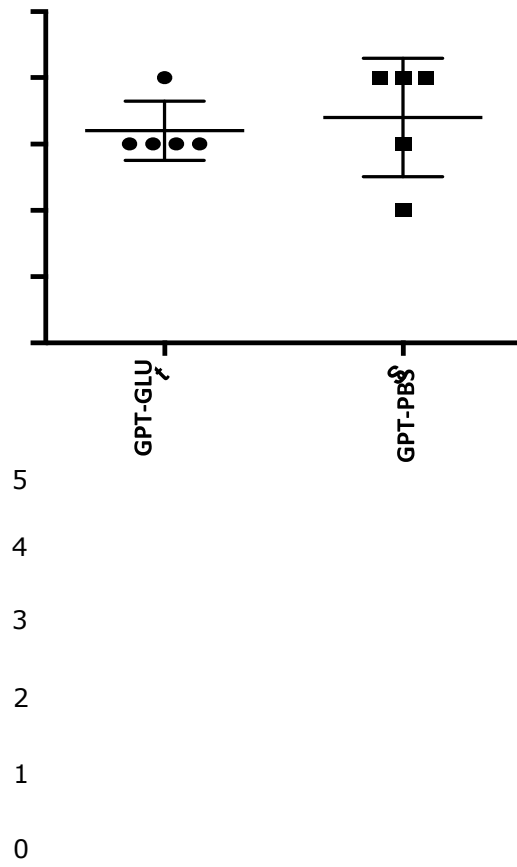
Para obter informações mais completas da sensibilização dos animais foi realizado o teste cutâneo. A Figura 16-B mostra a quantificação do inchaço da pata dos camundongos. Como pode ser visto, os camundongos que receberam albumina 2S mostraram um menor inchaço em comparação com camundongos sensibilizados com PLV ( $0,05 \pm 0,08$  vs.  $0,38 \pm 0,06$ , respectivamente), demonstrando assim que utilizando este protocolo de sensibilização contra albumina 2S de mamona, não houve indução das reações imediatas de hipersensibilidade. Nesse sentido, supõe-se que aumentar a dose da proteína albumina 2S usada na sensibilização. Os animais que receberam PLV + Ricina como adjuvante apresentaram sinais clínicos indicativos da sensibilização alérgica, sugerindo que a ricina na concentração testada nesse ensaio, pode ser usado como adjuvante na sensibilização de modelo animal para alergia alimentar.

#### **4.4 – Tratamento dos animais sensibilizados contra alérgenos do leite**

Para avaliar o tratamento *in vivo* com o ácido L-glutâmico e N-(4-nitrobenzoil)L-ácido glutâmico administramos as doses de 10 e 30 mg/kg por via intraperitoneal em camundongos Balb / c. Inicialmente, os animais foram sensibilizados contra os alérgenos do leite (PLV) e após esta etapa foi realizada uma etapa de desafio oral animais previamente sensibilizados e que não receberam tratamento, evidenciando que os animais estão alérgicos (com escore clínico entre 3 e 4), como mostrado na Figura 17-A.

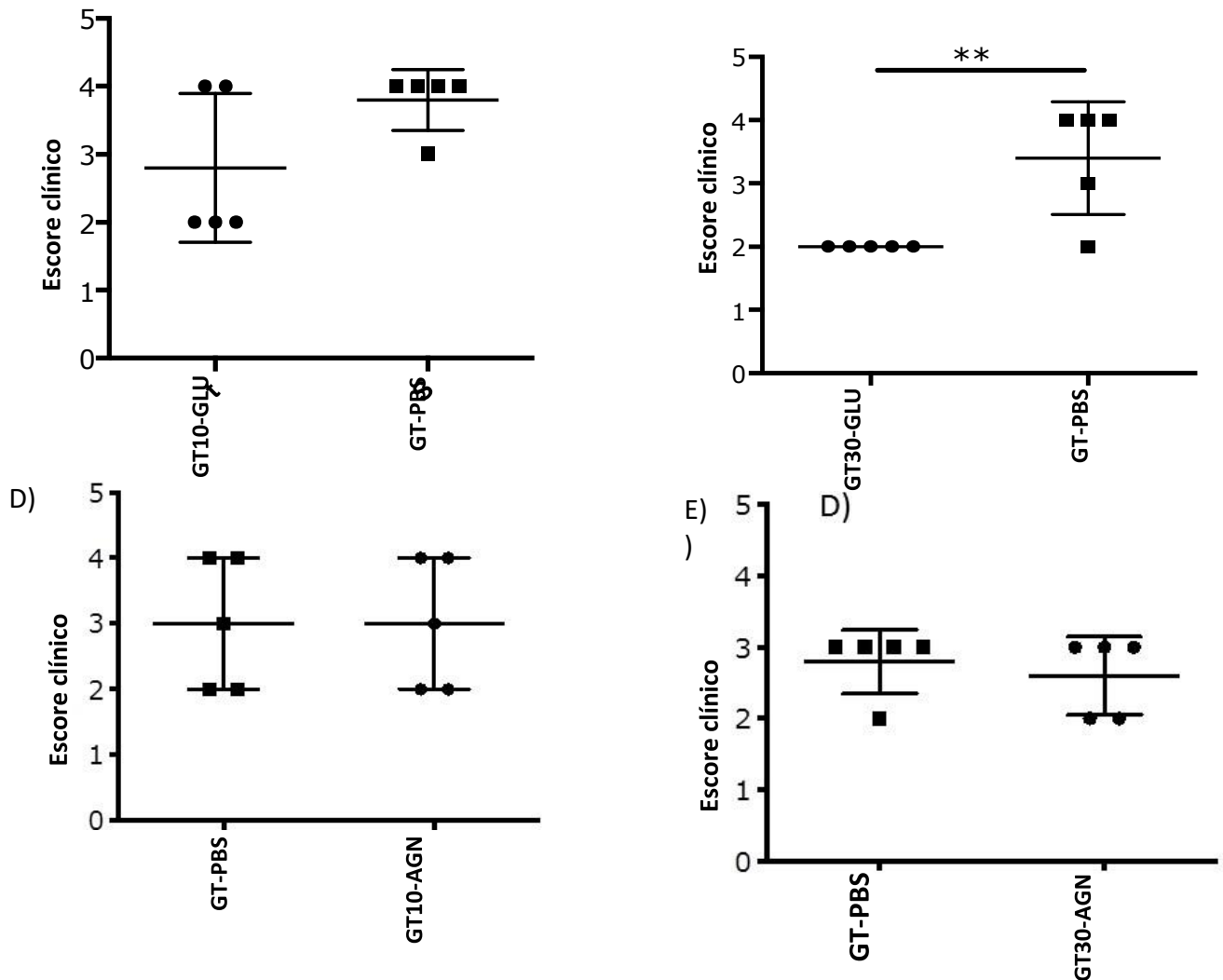


A)



B)

C)



**Figura 16:** Respostas *in vivo* do modelo animal após indução de alergia alimentar às Proteínas do Leite de Vaca (PLV). (A) Escores clínicos correspondentes aos sintomas desencadeados após os desafios orais com PLV, Grupo Pré-tratamento do glutâmico (GPTGLU) e PBS (GTPBS). (B) Grupo de Tratamento com 10 mg/kg de ácido L-glutâmico (GT10-GLU) (C) Grupo de Tratamento com 30 mg/kg de ácido L-glutâmico (GT30-GLU) . (D) Tratamento com 10 mg/kg de N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico (GT10-AGN). (E) Tratamento com 30 mg/kg de N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico (GT30-AGN). Os dados são expressos como os valores médios  $\pm$  SEM. PBS: tampão fosfato salino.

Após verificarmos que os animais estavam sensibilizados contra os alérgenos (Figura 17-A), iniciamos um protocolo de tratamento com o ácido L-glutâmico (10 mg/kg e 30 mg/kg), como mostrado na Figura 17-B e C, respectivamente. Nestes ensaios, administramos o aminoácido por via intraperitoneal, trinta minutos antes do desafio oral (DO) com o alérgeno.

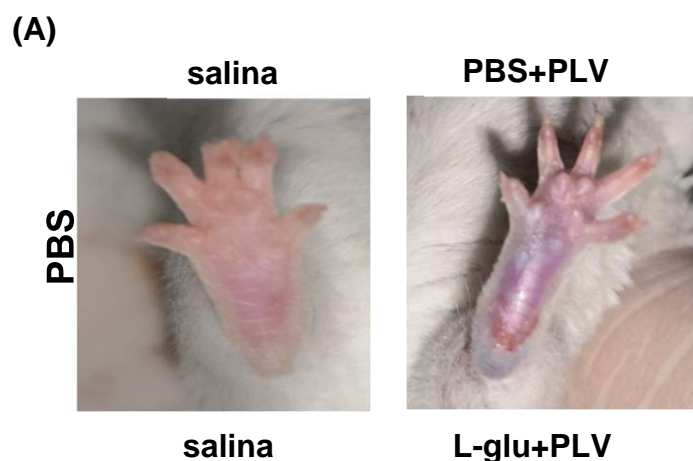
Outro protocolo de tratamento consistiu no uso do análogo N-(4-nitrobenzoil)L-ácido glutâmico nas doses 10 mg/kg e 30 mg/kg por via intraperitoneal. De acordo com os resultados mostrados na Figura 17-D e E, respectivamente. Observamos que o tratamento com o análogo não promoveu a redução dos sintomas alérgicos. No entanto, os camundongos que receberam tratamentos

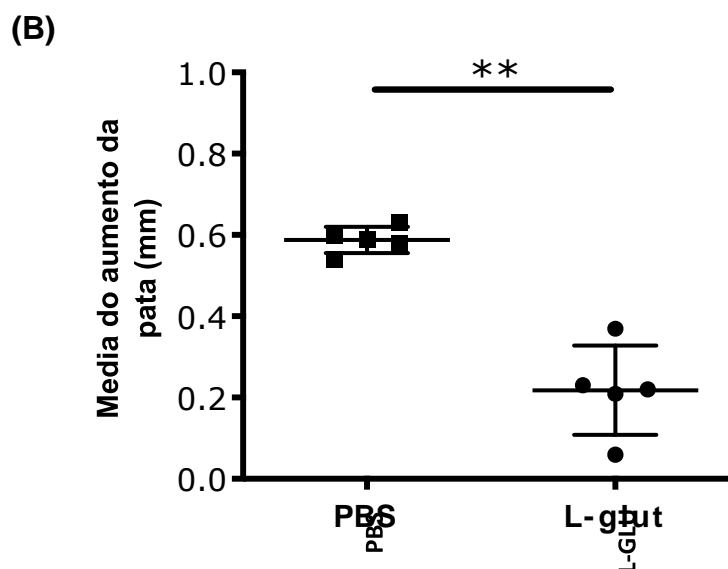
com 30 mg/kg do ácido L-glutâmico, trinta minutos antes do desafio oral com 10 mg de PLV, apresentaram uma redução significativa dos sinais clínicos da alergia observados nos animais (Figura 17-C).

#### **4.5 – Respostas in vivo da administração de ácido L-glutâmico como bloqueador de IgE**

Para obter uma compreensão mais ampla do efeito do tratamento com ácido L-glutâmico no modelo animal de alergia alimentar, analisamos a presença de mastócitos sensibilizados na pele, através do teste cutâneo.

Nos animais alérgicos e tratados com PBS ou ácido L-glutâmico 30 mg/kg (dose reduziu os sinais da alergia no escore clínico), foi realizado um teste cutâneo com injeção pela via subcutânea na parte superior da pata do camundongo (almofada plantar), a solução salina ou PLV e, em seguida foi injetado o corante por via intravenosa. Observamos um extravasamento menor do corante azul nos camundongos tratados com L-glu em comparação com os camundongos sensibilizados que receberam apenas a solução de PBS, sugerindo que a administração de L-glu (30 mg/kg), diminuiu a permeabilidade vascular e extravasamento do plasma, edema (Figura 18-A). A Figura 18-B mostra As medidas obtidas do inchaço da pata dos camundongos. Como pode ser visto, os camundongos tratados com L-glu mostraram um inchaço significativamente menor inchaço em comparação com camundongos sensibilizados (PBS) ( $0,23 \pm 0,08$  vs  $0,61 \pm 0,06$ , respectivamente), demonstrando assim uma redução da permeabilidade vascular após a administração do alérgeno.

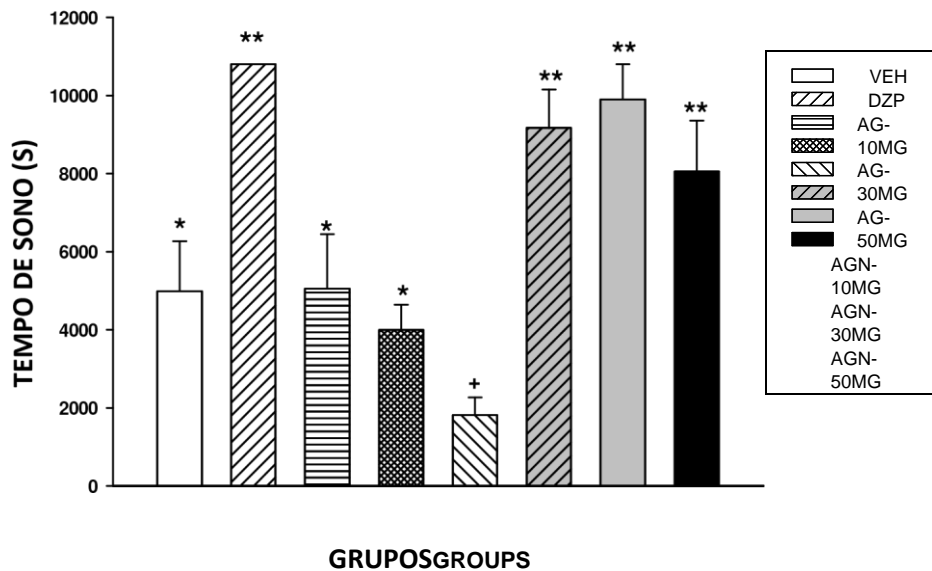




**Figura 17:** Respostas *in vivo* do modelo animal para alergia alimentar (Teste cutâneo) (A) Testes cutâneos em camundongos sensibilizados tratados com PBS e controle (B) Inchaço da pata quantificado nos animais controle (salina) e tratados com L-Glu 30 mg/kg. Os dados são expressos como os valores médios  $\pm$  SEM.

#### 4.6 - Teste de potencialização do tempo de sono

Neste teste foram analisados os parâmetros de sono induzido por tiopental sódico 40 mg/Kg. O grupo que recebeu 50 mg/kg do ácido L-glutâmico (AG-50MG) apresentou o menor tempo de sono que todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ). Enquanto que o grupo experimental que recebeu 10 e 30 mg/kg (AG-10 e AG-30) não apresentaram diferenças significativas em comparação ao veículo ( $p > 0,05$ ). Os grupos de animais tratados com o análogo AGN (10, 30 e 50 mg) apresentaram maior tempo de sono que o veículo, demonstrando assim que esses compostos podem potencializar o tempo de sono induzido por barbitúrico (Figura 19).

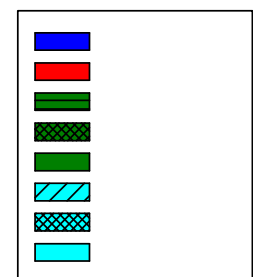


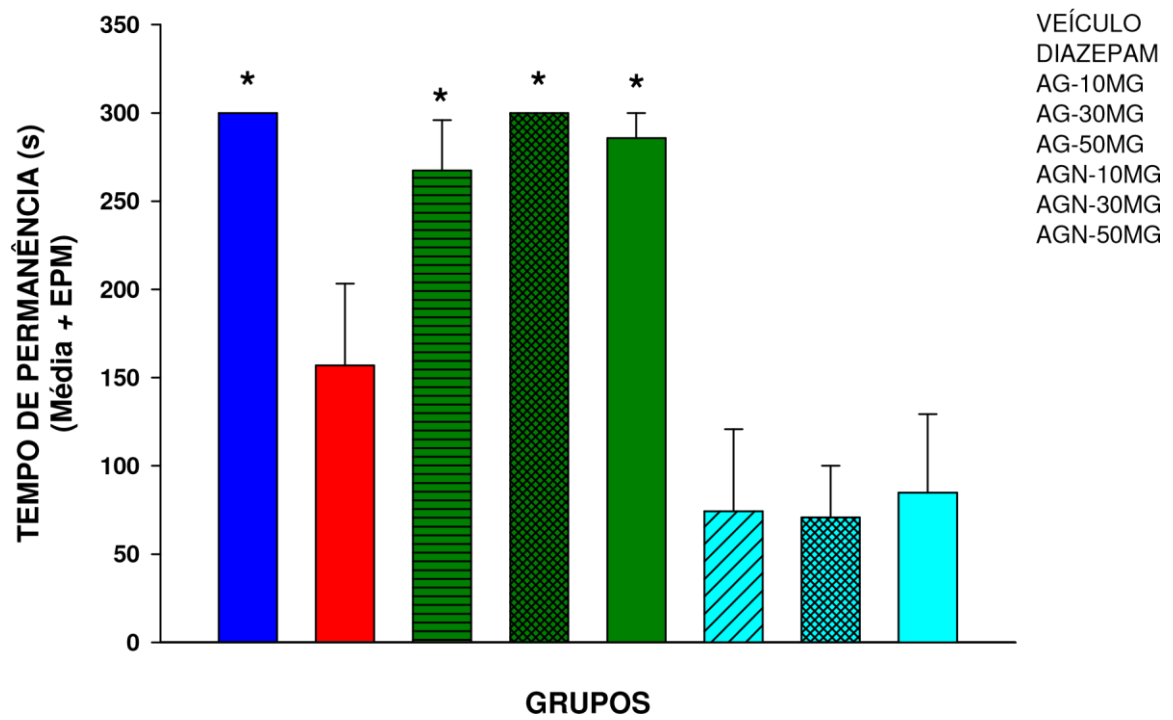
**Figura 18:** Avaliação do efeito de potencialização do tempo de sono induzido por tiopental de sódio (TPT). VEH = Veículo (solução fisiológica 0,9%)+TPT; DZP=Diazepam (5 mg/kg)+TPT; AG=Ácido L-glutâmico (10, 30 e 50 mg/kg)+TPT; AGN=N-4-Nitrobenzoil-Lácido glutâmico (10, 30 e 50 mg/kg)+TPT. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma fator seguida pelo pós-teste de Duncan. \* P <0,05 e \*\* P >0,05.

De acordo com estes resultados, verificamos que as doses de 10 e 30 mg/kg de ácido L-glutâmico não induziram a potencialização do tempo de sono dos animais, apresentando valores similares ao veículo, sendo que o tratamento com Diazepam (5 mg/kg) prolongou significativamente o tempo de sono dos animais (Figura 19).

#### 4.7 - Teste de coordenação motora (rota-rod)

Para avaliar o efeito do uso dos agentes bloqueadores como tratamento da alergia, sobre a coordenação motora, foi realizado o teste motor que avaliou o tempo de permanência no aparelho Rota-Rod após a administração de o ácido glutâmico (AG) e o análogo N-4-nitrobenzoil-L-ácido glutâmico (AGN) (10, 30 ou 50 mg/ kg).



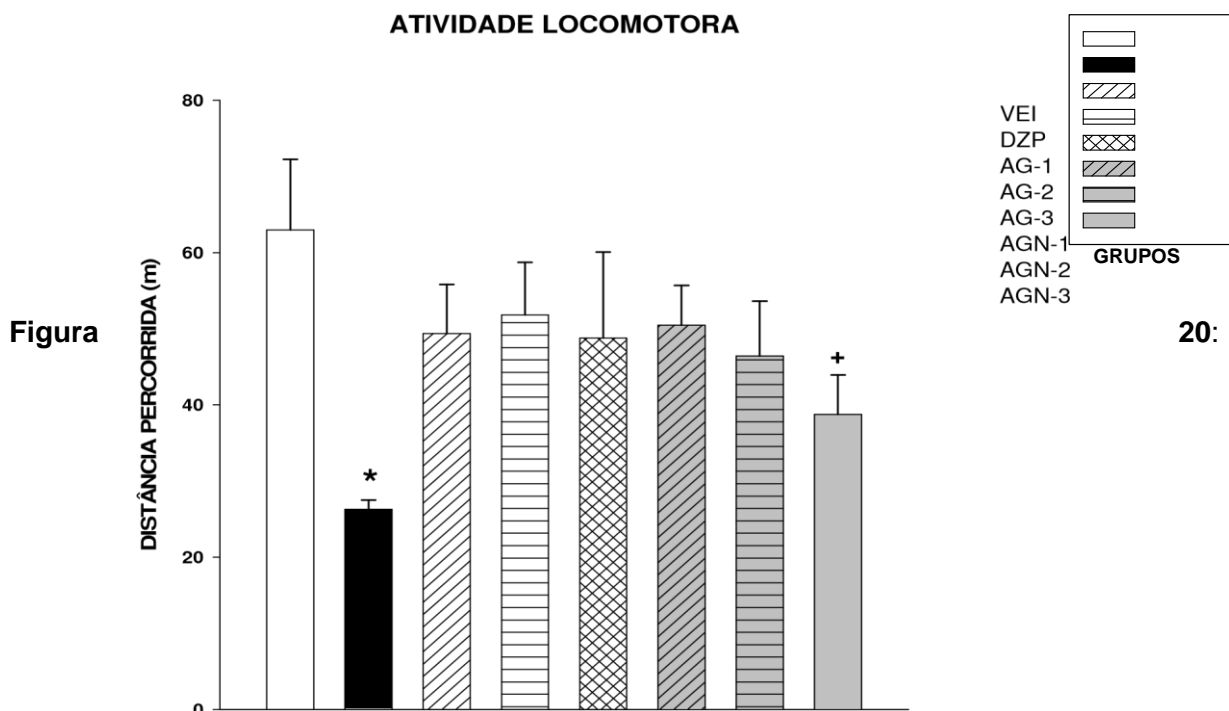


**Figura 19:** Avaliação do tempo de permanência no aparelho Rota-Rod após tratamentos com o ácido glutâmico e N-4-nitrobenzoil-L-ácido glutâmico. Veículo (solução fisiológica 0,9%); Diazepam (5 mg/kg); AG=Ácido L-glutâmico (10, 30 e 50 mg/kg); AGN=N-4 Nitrobenzoil-L-ácido glutâmico (10, 30 e 50 mg/kg). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma fator seguida pelo pós-teste de Duncan. \* P <0,05 e \*\* P >0,05.

Os resultados mostraram que o grupo tratado com Ácido L-glutâmico 30 mg/kg apresentou tempo de permanência no aparelho Rota-Rod igual ao veículo (300 s), sendo que o grupo que recebeu Diazepam (5 mg/kg) apresentou tempo reduzido de permanência na barra giratória (150 s). Os camundongos que receberam o análogo AGN (10, 30 e 50 mg/kg) também apresentaram diminuição desse tempo, atingindo valores menores que o Diazepam (Figura 20).

#### **4.8 – Avaliação da movimentação espontânea**

No teste do campo aberto foi avaliada a atividade de locomoção dos animais tratados. Antes do teste de locomoção, os animais foram submetidos a um período de habituação de 3 dias consecutivos na arena experimental. O objetivo desse procedimento é eliminar o efeito da novidade assegurando que os resultados do teste são em decorrência dos tratamentos administrados.



Avaliação da atividade locomotora dos camundongos após tratamentos com o ácido glutâmico e N-4-nitrobenzoil-L-ácido glutâmico. VEI=Veículo (solução fisiológica 0,9%); DZP=Diazepam (5 mg/kg); AG=Ácido L-glutâmico; AGN=N-(-4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico (1) 10 mg/kg, (2) 30 mg/kg e (3) 50 mg/kg. Média e Erro Padrão da Média do teste da atividade locomotora. \* indica atividade locomotora menor que todos os outros grupos, exceto os grupos AGN-2 e AGN-3. + indica atividade locomotora menor que o grupo VEI (ANOVA de um fator seguida pelo teste de Duncan;  $p > 0.05$ ).

A figura 21 apresenta os resultados da atividade locomotora dos animais tratados com veículo, diazepam e três concentrações diferentes do AG e do AGN. A ANOVA de um fator mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(7, 40) = 2,22; p = 0,05$ ] e o teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou que o grupo DZP apresentou atividade locomotora menor que os demais grupos ( $p < 0,05$ ), exceto os grupos AGN-2 e AGN-3. Não houve diferença entre os grupos DZP, AGN-2 e AGN-3 ( $p > 0,05$ ). A atividade locomotora do grupo AGN-2 não foi diferente estatisticamente dos demais grupos ( $p > 0,05$ ). Já o grupo AGN-3 apresentou atividade locomotora menor que o grupo veículo ( $p < 0,05$ ).

## 5. Discussão



Desde o entendimento da importância clínica da atividade específica da IgE no desencadeamento das reações alérgicas, novas estratégias terapêuticas para a prevenção e tratamento dessas reações, vem sendo desenvolvidas. Além disso, a frequência de doenças alérgicas mediadas por IgE aumentou significativamente nas últimas décadas, ampliando a preocupação sobre como desenvolver abordagens preventivas alternativas para a implementação de novos tratamentos, a fim de controlar os distúrbios causados pela alergia (Ozdemir *et al.*, 2016) .

Estudos realizados pelo nosso grupo, demonstraram através de ensaios de desgranulação de mastócitos, que pode haver reatividade cruzada entre as albuminas 2S de mamona e alérgenos de amendoim e soja, que são amplamente consumidos na alimentação humana (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011). Dessa forma, elucidar os epitopos presentes nestas e outras proteínas alergênicas é crucial para desenvolvimentos de estratégias terapêuticas específicas e abrangente para diversos tipos de alergia.

Dentre as terapias alérgeno não-específicas para o tratamento de doenças alérgicas, duas estratégias principais, tem sido abordadas: a primeira baseia-se no bloqueio da Interação IgE aos seus receptores de alta afinidade (FcεRI), e a segunda estratégia é interferir na sinalização gerada pela ligação da IgE ao receptor (FcεRI) (Blank, Charles e Benhamou, 2016). O conhecimento do papel fisiopatológico dos anticorpos IgE permitiu o desenvolvimento de novas estratégias contra diversas doenças alérgicas.

O objetivo do estudo apresentado foi avaliar o uso de ácido glutâmico livre e o análogo N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico como agentes bloqueadores de IgE em ensaios *in vivo* para desenvolver uma nova estratégia para o tratamento da alergia, baseada no bloqueio da interação do alérgeno com a IgE. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo investigaram a importância dos ácidos glutâmicos na formação de epitopos de ligação à IgE, a sua presença foi identificada nas duas isoformas alergênicas, Ric c 1 e Ric c 3, ambas da albumina 2S de mamona (*Ricinus communis*) (Felix *et al.*, 2008; Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011).

Robotham *et al.* (2002) também identificaram um epitopo contínuo (QGLRGEEMMV) no alérgeno Jug r 1 presente na noz inglesa que reage com a IgE. Neste epitopo, a presença do ácido glutâmico numa distância mínima de 12 resíduos de aminoácidos foi fundamental para que houvesse a ligação com a IgE

(Robotham *et al.*, 2002). Ensaios *in vitro* demonstraram que a utilização de análogos do ácido L-glutâmico poderia ser uma abordagem alternativa para bloqueio de IgE (Campos-Mesquita, 2016).

Primeiramente, extraímos as albuminas 2S das sementes de mamona, através da metodologia inicialmente descrita por (Thorpe, Kemeny e Panzani, 1988) com algumas adaptações, empregamos a cromatografia de fase reversa (sistema HPLC-C18) para obtermos as isoformas, Ric c 1 e Ric c 3, caracterizadas como alergênicas (Felix *et al.*, 2008). Após etapas de purificação separamos três frações proteicas (F1, F2 e F3), a fração F1 consiste numa fração de alto peso molecular, onde está contida a proteína ricina (Figura 12 e 13). A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, é o seu principal componente tóxico (Carvalho, Souza e Machado, 2018). Nos protocolos de imunização com o “pool” de albuminas 2S, utilizamos camundongos BALB/c, pois, esta linhagem é conhecida por desenvolver resposta positivas para alérgenos, ou seja, perfil de resposta Th2 (Jyonouchi *et al.*, 2001). Os animais foram imunizados por via intraperitoneal com 1 e 10 µg de albumina 2S. O intervalo entre cada imunização foi de sete dias, após cinco injeções da proteína (Dia 35), o soro dos animais foi avaliado quanto a produção de imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgE específicas.

No resultado apresentado na figura 14, observamos que os animais imunizados com 10 µg da proteína apresentaram níveis maiores dos anticorpos avaliados, a absorbância para IgE foi ligeiramente mais alta em comparação ao protocolo usando 1 µg de proteína (0,550 vs 0,430, respectivamente). De acordo com Chen *et al.* (2013), para sensibilização à ovalbumina (OVA) em camundongos BALB / c, os maiores níveis de IgE específica foram obtidos após cinco imunizações com uma dose de 0,05 mg de proteína (Chen *et al.*, 2013). Nesse sentido, novas imunizações poderiam ser realizadas a fim de obter soros com níveis mais altos de IgE específica.

Com relação ao anticorpo IgG1, observou-se que os níveis apresentados para o protocolo que utilizou 10 µg/imunização, são mais altos em comparação ao que utiliza apenas 1 µg (0,758 vs 0,437). No modelo animal usado neste estudo as imunoglobulinas IgG1, que assim como a IgE também são características de um perfil de resposta TH2, podem ser responsáveis pela mediação de hipersensibilidade

imediate em camundongos, como demonstrado em estudos anteriores. Sabe-se que em camundongos a IgG1 se liga a receptores Fc na superfície de mastócitos e promovem desgranulação quando expostos a um alérgeno específico, aumentando a liberação de histaminas (Li, Xui Min et al., 2001)..

Os alérgenos de mamona, pertencentes à classe das albuminas 2S, apresentaram reatividade cruzada com alérgenos de fontes alimentares ou aeroalérgenos, como camarão, peixe, milho, trigo, soja, amendoim, poeira doméstica, tabaco e fungos presentes no ar (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011). Sabe-se também que a exposição aos alérgenos presentes no pólen ou nas sementes de mamona pode tornar o indivíduo atópico sensibilizado e desencadear uma resposta alérgica ao ser exposto a outras fontes alergênicas. Verificamos através de ensaio imuno-enzimático, que o ácido L-glutâmico é capaz de bloquear a reação cruzada entre os alérgenos de mamona e os de outra fonte como: amendoim, camarão, peixe, milho, gramíneas, poeira doméstica e tabaco. Neste trabalho mostramos que o ácido glutâmico promoveu um bloqueio de IgE, de 100% para os alérgenos de: mamona, tabaco e milho, superior a 75% para alérgenos da poeira doméstica e peixe. e uma inibição acima de 50% para alérgenos de gramíneas e de amendoim (Figura 15), mostrando o potencial do uso deste aminoácido para inibir ou reduzir a ligação de IgE a alérgenos, desde que sejam conhecidos os epitopos de afinidade com a IgE. Baseado nesta constatação o bloqueio de IgE por L-Glu talvez possa ser extrapolado para outros alérgenos.

Considerando que nos ensaio de ELISA para bloqueio de IgE, o pH foi mantido próximo do fisiológico (7,0), condições em que a IgE funciona normalmente no organismo, podemos inferir que houve uma interação eletrostática. Nesse pH, o aminoácido ácido glutâmico livre, carrega cargas negativas dos grupos carboxila, podendo formar pares de íons com os resíduos de aminoácidos carregados positivamente presentes nas moléculas de IgE (Chung e Reed, 2015). Outra forma de reconhecimento molecular entre anticorpo e antígeno pode envolver algumas alterações conformacionais do antígeno ou anticorpo antes da formação do complexo de ligação, tendo em vista que as suas superfícies moleculares estão em constante movimento (Hubbard *et al.*, 2013).

Vários modelos para alergia alimentar já foram descritos na literatura utilizando toxina de cólera (TC) como adjuvante Li *et al.*, 1999. No presente trabalho, adaptamos a

metodologia de Li *et al.*, 1999; Adel-Patient *et al.*, 2005 e Menezes *et al.*, 2012, utilizando a ricina (0,04 µg) como adjuvante. A TC e a ricina são proteínas inibidoras de ribossomas que podem provocar morte quando ingeridas (Carvalho, Souza e Machado, 2018; Wernick *et al.*, 2010). Estima-se que a dose oral letal por ingestão de ricina em humanos é de um a vinte miligramas por quilograma (Hayon, Smith e King, 2020). Um estudo realizado em camungos relatou que a dose de 25 µg/kg foi capaz de provocar intoxicação (Kumar, Sugendran e Vijayaraghavan, 2003). A concentração de ricina utilizada neste experimento foi de 0,04 µg, cerca de vinte vezes inferior à dose considerada letal. Estas toxinas, em dose sub-letal podem melhorar a permeabilidade das proteínas alergênicas, favorecendo uma resposta Th2, necessária para conduzir testes *in vivo* de drogas para o tratamento da alergia. O modelo de imunização (n=5) empregando ricina como adjuvante para alergia alimentar a alérgenos do leite de vaca, apresentou uma resposta positiva. Os escores clínicos de aproximadamente 0,3 e a média do aumento do inchaço na pata (teste cutâneo) de 0,4 observados são indicativos de resposta alérgica. Estes resultados sugerem que assim como a toxina de cólera, amplamente utilizada nas imunizações intragástricas, a ricina, uma toxina bem mais fácil de ser manipulada e isolada em laboratórios de pesquisa, possa representar um novo adjuvante a ser utilizado no modelo de alergia alimentar (Adel-Patient *et al.*, 2005; Diesner *et al.*, 2008; Ganeshan *et al.*, 2009; Verhasselt, 2010). Todavia ainda são necessários estudos para ajustar a dose mínima a ser empregada nos processos de sensibilização.

Nas condições testadas, as albuminas 2S de mamona demonstraram baixa indução dos sinais clínicos de alergia, de acordo com o escore clínico (Figura 16-A). Sabe-se que as proteínas presentes nas sementes de mamona não fazem parte da alimentação humana, porém realizamos a sua administração oral nos camundongos para obter modelos animais para os testes comportamentais. Por outro lado, alérgenos presentes na mostarda amarela (*Sinapis alba*, Sin a 1) e mostarda oriental (*Brassica juncea*, Bra j 1), nozes (Ber e 1) e gergelim (*Sesamum indicum*, Ses i 1), são classificadas como albuminas 2S (Moreno e Clemente, 2008), assim, ajustar condições de imunizações por via oral, empregando ricina para este grupo de proteínas, pode ser uma contribuição importante para estudo de alergia alimentar contra alérgenos destas fontes.

Os tratamentos convencionais para a APLV consistem em evitar ou substituir os alimentos alergênicos e tratar os sintomas das reações alérgicas (Sicherer e Sampson, 2014). Contudo, diferentes formas de tratamento vêm sendo propostas, por exemplo, imunoterapia alérgeno específica, indução de tolerância oral por uso de fórmulas hipoalergênicas, terapia alérgica não específica com anticorpos anti-IgE e com probióticos (Skripak, J. M. et al., 2008). Em busca de um nova abordagem terapêutica para o tratamento da alergia baseada no bloqueio de IgE, mostramos que a administração intraperitoneal do ácido L-glutâmico *in vivo* reduziu os sintomas da hipersensibilidade mediada por IgE (Figura 19-C) no modelo animal para alergia alimentar usando como adjuvante toxina de cólera. Já os animais que foram tratados com N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico (AGN), na mesma dose terapêutica administrada por via intraperitoneal, não apresentaram redução dos sintomas alérgicos, sugerindo a especificidade da interação do ácido L-glutâmico livre com a região de reconhecimento dos epítopos alergênicos na molécula e IgE.

Neste mesmo modelo animal (n=5), foi realizado o teste cutâneo, após injeção local de PLV (alérgeno), na pata dos camundongos sensibilizados, a resposta alérgica aguda foi induzida levando à liberação de histamina dos mastócitos, proteoglicanos e outros mediadores inflamatórios, essa reação foi evidenciada pela marcação com corante azul e edema local (Figura 18 A). Nos animais alérgicos (n=5) tratados com 30 mg/kg, i.p., do ácido L-glutâmico (AG), observou-se significativa redução da coloração azul e do inchaço da pata, indicando a diminuição da ativação dos mastócitos e da permeabilidade vascular (Figura 18 B).

O estudo realizado por Aswar *et al.*, 2015, avaliou o efeito da administração de 40 mg/kg de Piperina (PIP) um composto orgânico, alcalóide, presente na pimenta preta (*Piperis Nigrum*), nos animais sensibilizados contra Ova-albumina (OVA) e observou que o tratamento inibiu o edema da pata desses animais, indicando sua eficácia na redução da liberação da histamina (Aswar *et al.*, 2015). No presente estudo, os animais foram sensibilizados com o leite completo, ou seja, contendo várias proteínas, entre elas a alphaS1-caseína e alphaS2-caseína, as quais também contém inúmeros resíduos de ácidos glutâmicos e ácido aspártico em seus epítopos ligantes de IgE como descrito por Chatchatee *et al.*, 2001, Spuergerin *et al.*, 1996 e Busse *et al.*, 2002. A hipótese é de que a administração intraperitoneal de L-glu tenha bloqueado

parcialmente a interação da IgE com os alérgenos prevenindo assim a ativação dos mastócitos e conseqüentemente reduzindo os sinais clínicos da reação alérgica.

O ácido glutâmico é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e a estimulação excessiva dos receptores de glutamato pode causar efeitos neurotóxicos, também conhecidos como excitação neurotóxica (Jayanarayanan *et al.*, 2013). Sabe-se que o glutamato monossódico (MSG) está amplamente disponível como produto químico intensificador do sabor em diversos alimentos. Estudos relatam que exposição ao MSG em pacientes asmáticos pode potencializar os sintomas da asma (Woessner, Simon e Stevenson, 1999). Alguns estudos associam a ingestão de MSG como possível causa de dor de cabeça (Obayashi e Nagamura, 2016). Neste trabalho, investigamos o uso de concentrações de L-Glu 10, 30 e 50 mg/kg), superiores às doses terapêuticas. Aswar *et al.*, 2015, utilizaram doses similares: 10, 20 e 40 mg/kg do composto PIP para tratamento dos sintomas da alergia induzida por OVA e obteve resultados promissores (Aswar *et al.*, 2015).

O teste de potencialização do tempo de sono induzido por barbitúrico, o teste motor com aparelho Rota-rod e o teste que mede movimentação espontânea em campo aberto foram realizados para uma avaliação comportamental nos animais tratados para verificar os possíveis efeitos adversos das doses dos compostos proposto nesse trabalho. Estes testes comportamentais são recomendados para uma triagem farmacológica de protótipos a fármaco (Naghbi e Rayatnia, 2011; Bocca, Resende e Ko, 2012; Sharmen *et al.*, 2014). O diazepam promove uma diminuição significativa no escore locomotor indicando um efeito sedativo (Thakur e Mengi, 2005) e foi usado como controle. O aminoácido L-Glu não apresentou este efeito. No entanto, as doses 10, 30 e 50 mg/kg do análogo N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico mostrou uma diminuição no escore locomotor (Figura 20) e na avaliação da movimentação espontânea na arena a dose de 50 mg/kg apresentou atividade locomotora menor que o grupo controle do veículo (Figura 21). O composto N-(4nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico produziu um aumento significativo no nível do efeito hipnótico induzido pelo tiopental de sódio (figura 19).

O tiopental é basicamente um agente hipnótico, dado em dose apropriada, a hipnose induzida por tiopental potencializa a Inibição pós-sináptica mediada por GABA através de modificações alostéricas dos receptores gabaérgicos. Substâncias que possuem

atividade depressora do SNC pode diminuir o tempo de início do sono, prolongar a duração do sono ou ambos (Hasan *et al.*, 2009). Esses resultados são indicativos de um efeito sedativo notável que foi ainda mais intensificado pela potencialização da hipnose induzida por barbitúrico após a administração i.p do análogo N-(4-nitrobenzoil)-L-ácido glutâmico.

Os resultados deste estudo mostram que o ácido L-glutâmico produz efeitos diferenciados de acordo com a dose avaliada. No tratamento com as doses 10 e 30 mg/kg do L-Glu, os animais não apresentaram diferenças significativas no tempo de sono quando comparados com o controle (veículo), porém os animais que receberam a dose de 50 mg/kg produziram um menor tempo de sono, mostrando uma relação dose-dependente e podendo também indicar um efeito estimulante do L-Glu sobre o SNC (Figura 19). Novos experimentos deverão ser realizados para melhor entendimento da atividade depressora ou estimulante desses compostos. A atividade locomotora é considerada um índice de alerta, onde também pode ser avaliado o efeito sobre o equilíbrio motor, tônus muscular no caso do uso do modelo rota rod, e caso seja diminuída pode indicar efeito sedativo. Neste estudo, verificamos que as doses testadas do ácido L-glutâmico não afetam a atividade locomotora (figura 21) e não causam efeito sobre a coordenação motora e tônus muscular, como indicado pelos resultados relativos ao modelo rotarod (figura 20).

As estratégias de imunizações dos animais, etapa preliminar para a realização dos ensaios de bloqueio *in vivo*, para modelo animal alérgico às albuminas 2S, mostraram êxito. A ricina foi um potencial adjuvante para imunização por gavagem, quando PLV foi usada como antígeno. No entanto, novas imunizações utilizando ricina como adjuvante devem ser conduzidas para ajuste da dose. Algumas mudanças no protocolo experimental de imunização, devem ser realizadas para melhorar os resultados de produção de IgE, incluindo cronograma das injeções, vias de administração e doses do antígeno. O nosso trabalho mostra que é possível utilizar o ácido L-glutâmico como abordagem alternativa para o tratamento das alergias, porém o efeito estimulante ou depressor do tratamento com ácido L-glutâmico, bem como a ativação de receptores glutamatérgicos específicos, devem ser melhor investigadas. Portanto, novos estudos devem ser realizados buscando investigar as doses

terapêuticas com maior eficácia e segurança para sua utilização futuramente como um fármaco.

## **6- Conclusão**

- O ácido L-glutâmico atua como bloqueador de IgE específica contra alérgenos de mamona e apresenta potencial farmacológico para o tratamento de doenças envolvendo alérgenos de mamona, proteínas do leite de vaca e outros alérgenos com resposta cruzada.



- A administração do ácido L-glutâmico foi capaz de bloquear a IgE específica nos animais sensibilizados contra alérgenos do leite, reduzindo os sinais clínicos observados *in vivo*..
- O ácido glutâmico não provocou alterações comportamentais nos camundongos que receberam doses até 30 mg/kg.
- A ricina apresentou potencial como adjuvante para induzir resposta alérgica, podendo ser um aliado para a formação de modelos animais experimentais para testes farmacológicos.

## 7 - Referências Bibliográficas

AALBERSE, R.C. Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106: 228-238, 2000.

AALBERSE RC, CRAMERI R. IgE-binding epitopes: a reappraisal. *Allergy*; 66: 1261–1274, 2011.

ALMEIDA & BARBOSA-FILHO, 2006 in ALMEIDA, R. N. (org.) *Psicofarmacologia: Fundamentos práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2006.

A.M. MAHDY, N.R. WEBSTER. Histamine and antihistamines. *Anaesth Intensive Care Med* 2008; 9: 324–328.

ADEL-PATIENT, K. *et al.* Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy*, v. 60, n. 5, p. 658–664, maio 2005.

ASRAT, S. *et al.* Chronic allergen exposure drives accumulation of long-lived IgE plasma cells in the bone marrow, giving rise to serological memory. *Science immunology*, v. 5, n. 43, 2020.

ASWAR, U. *et al.* Antiallergic effect of piperine on ovalbumin-induced allergic rhinitis in mice. *Pharmaceutical Biology*, v. 53, n. 9, p. 1358–1366, 2015.

BAUMANN, M. J. *et al.* DARPins against a functional IgE epitope. *Immunology Letters*, v. 133, n. 2, p. 78–84, 2010.

BELLIONI-BUSINCO, B. *et al.* Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 103, n. 6, p. 1191–1194, 1999.

BERMAN, P.; NIZRI, S.; WIESMAN, Z. Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 7, p. 2861–2866, 2011.

BLANC, F. *et al.* Capacity of purified peanut allergens to induce degranulation in a functional in vitro assay: Ara h 2 and Ara h 6 are the most efficient elicitors. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 39, n. 8, p. 1277–1285, 2009.

BLANK, U.; CHARLES, N.; BENHAMOU, M. The high-affinity immunoglobulin e receptor as pharmacological target. *European Journal of Pharmacology*, v. 778, p. 24–32, 2016.

BLAZOWSKI, L. *et al.* Food allergy endotype with high risk of severe anaphylaxis in children—Monosensitization to cashew 2S albumin Ana o 3. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 74, n. 10, p. 1945–1955, 2019.

BOCCA, W.; RESENDE, V. DE; KO, G. M. Teste de rotarod : contribuições no estudo das doenças neuromusculares , das síndromes extrapiramidais e das. n. i, 2012.

BOYCE, J. A. *et al.* Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 64, n. 1, p. 175–192, 2011.

BREITENEDER, H.; MILLS, E. N. C. Plant food allergens—structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, v. 23, n. 6, p. 395–399, 2005.

BREITENEDER, H.; RADAUER, C. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 113, p. 821–830, 2004.

BUSSE, P. J. *et al.* Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine  $\alpha$ s2casein in cow's milk allergic patients. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 129, n. 1, p. 93–96, 2002.

CALABRIA, C. W.; DIETRICH, J.; HAGAN, L. Comparison of serum-specific IgE (ImmunoCAP) and skin-prick test results for 53 inhalant allergens in patients with chronic rhinitis. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*, v. 30, n. 4, p. 386–396, 2009.

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.

CARVALHO, D. O.; SOUZA, S. DE; MACHADO, O. L. T. A modified , hypoallergenic variant of the Ricinus communis Ric c1 protein retains biological activity. v. 0, n. February, p. 1–13, 2018.

CHAMBI, H. N. M. *et al.* Protein extracted from castor bean (*Ricinus communis* L.) cake in high pH results in films with improved physical properties. *Industrial Crops and Products*, v. 61, p. 217–224, 2014.

CHAN, A. P. *et al.* Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nature Biotechnology*, v. 28, n. 9, p. 951–956, 2010.

CHEN, C. *et al.* A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: Comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. *Food and Chemical Toxicology*, v. 62, p. 41–47, 2013.

CHUNG, S.; REED, S. IgE binding to peanut allergens is inhibited by combined D aspartic and D -glutamic acids. *FOOD CHEMISTRY*, v. 166, p. 248–253, 2015.

CHURCH, D. S.; CHURCH, M. K. Pharmacology of Antihistamines. *World Allergy Organization Journal*, v. 4, n. 3, p. S22–S27, 2011.

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

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.

DANTZER-WOOD. Therapeutic approaches for the treatment of food allergy. Expert Opinion on Pharmacotherapy, v. 19, n. 5, p. 1045–1048, 2019.

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.

DIESNER, S. C. *et al.* Dose-dependent food allergy induction against ovalbumin under acid-suppression: A murine food allergy model. Immunology Letters, 2008.

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.

FIOCCHI, A. *et al.* World allergy organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. Pediatric Allergy and Immunology, v. 21, n. SUPPL. 21, p. 1–125, 2010.

FOSTER, J. T. *et al.* Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (Ricinus communis). BMC Plant Biology, v. 10, 2010.

FREITAS, G. A. Informe Rural Etene. 200.217.154.7, 2011.

FUC, E.; ZŁOTKOWSKA, D. of the Immune Response in Mice. 2019.

GANESHAN, K. *et al.* Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: A new murine food allergy model. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009.

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

HAMILTON, R. G.; MACGLASHAN, D. W.; SAINI, S. S. IgE antibody-specific activity in human allergic disease. *Immunologic Research*, v. 47, n. 1–3, p. 273–284, 2010.

HAN, N. *et al.* Identification of amino acids critical for IgE-binding to sequential epitopes of bovine  $\beta$ -casein and the similarity of these epitopes to the corresponding human  $\beta$ -casein sequence. n. 7, p. 198–204, 2008.

HANI, M.; MOHAMED, H. Improving quantity and quality of castor bean oil for biofuel growing under severe conditions in Egypt. *Energy Procedia*, v. 68, p. 117–121, 2015.

HASAN, S. M. R. *et al.* Sedative and anxiolytic effects of different fractions of the *Commelina benghalensis* Linn. v. 3, n. 5, p. 221–227, 2009.

HAYES, W. C. *The Scepter of Egypt: A Background for the Study of the Egyptian Antiquities in The Metropolitan Museum of Art. Vol. 2, The Hyksos Period and the New Kingdom (1675–1080 B.C.)*, 1990.

HAZEBROUCK, S. *et al.* Variable IgE cross-reactivity between peanut 2S-albumins: The case for measuring IgE to both Ara h 2 and Ara h 6. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 49, n. 8, p. 1107–1115, 2019.

HILL, D. J. *et al.* Manifestations of milk allergy in infancy: Clinical and immunologic findings. *The Journal of Pediatrics*, v. 109, n. 2, p. 270–276, 1986.

HOCHWALLNER, H. *et al.* Cow ' s milk allergy : From allergens to new forms of diagnosis , therapy and prevention q. *Methods*, v. 66, n. 1, p. 22–33, 2014.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? *International archives of allergy and immunology*, v. 122, n. 3, p. 155–66, 2000.

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

HOLM, J. *et al.* Facilitated antigen presentation and its inhibition by blocking IgG antibodies depends on IgE repertoire complexity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 127, n. 4, p. 1029–1037, 2011.

HUBBARD, M. A. *et al.* Stereo-selective binding of monoclonal antibodies to the polygamma- d -glutamic acid capsular antigen of *Bacillus anthracis*. *Molecular Immunology*, v. 55, n. 3–4, p. 337–344, 2013.

IGUCHI, N. *et al.* The antihistamine olopatadine regulates T cell activation in palladium allergy. *International Immunopharmacology*, v. 35, p. 70–76, 2016.

JAYANARAYANAN, S. *et al.* NMDA and AMPA receptor mediated excitotoxicity in cerebral cortex of streptozotocin induced diabetic rat: ameliorating effects of curcumin. *Chemico-biological interactions*, v. 201, n. 1–3, p. 39–48, 2013.

JENSEN-JAROLIM, E.; JENSEN, A. N.; CANONICA, G. W. Debates in allergy medicine: Molecular allergy diagnosis with ISAC will replace screenings by skin prick test in the future. *World Allergy Organization Journal*, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2017.

JOLLIFFE, N. A. *et al.* Transport of ricin and 2S albumin precursors to the storage vacuoles of *Ricinus communis* endosperm involves the Golgi and VSR-like receptors. *Plant Journal*, v. 39, n. 6, p. 821–833, 2004.

KLEBER-JANKE, T. *et al.* Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 119, n. 4, p. 265–274, 1999.

KNOL, E. F. *et al.* Management of cow's milk allergy from an immunological perspective: What are the options? *Nutrients*, v. 11, n. 11, p. 1–8, 2019.

KOLETZKO, S. *et al.* Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: Espghan gi committee practical guidelines. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 55, n. 2, p. 221–229, 2012.

KUMAR, O.; SUGENDRAN, K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. *Toxicon*, v. 41, n. 3, p. 333–338, 2003.

KUMAR, S. *et al.* Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *International Immunopharmacology*, v. 13, n. 4, p. 432–439, 2012.

LAM, H. Y. *et al.* Cow's milk allergy in adults is rare but severe: Both casein and whey proteins are involved. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 38, n. 6, p. 995–1002, 2008.

LANSER, B. J. *et al.* Current Options for the Treatment of Food Allergy. *Pediatric Clinics of North America*, v. 62, n. 6, p. 1531–1549, 2015.

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

LI, X. *et al.* A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 103, n. 2, p. 206–214, fev. 1999.

LIMA, R. L. S. *et al.* Blends of castor meal and castor husks for optimized use as organic fertilizer. *Industrial Crops and Products*, v. 33, n. 2, p. 364–368, 2011.

LIN, J. *et al.* The expression and processing of two recombinant 2S albumins from soybean (*Glycine max*) in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1698, n. 2, p. 203–212, 2004.

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

LUCAE, S. *et al.* IgE responses to exogenous and endogenous allergens in atopic dermatitis patients under long-term systemic cyclosporine A treatment. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 71, n. 1, p. 115–118, 2016.

MANUYAKORN, W.; TANPOWPONG, P. Paediatrics and International Child Health Cow milk protein allergy and other common food allergies and intolerances. *Paediatrics and International Child Health*, v. 9047, p. 1–9, 2018.

MATSUO, H.; YOKOOJI, T.; TAOGOSHI, T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International*, v. 64, n. 4, p. 332–343, 2015a.

\_\_\_\_. Allergology International Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International*, v. 64, n. 4, p. 332–343, 2015b.

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.

MENEGUELLI DE SOUZA, L. C. *et al.* Cell toxicity by ricin and elucidation of mechanism of Ricin inactivation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 113, p. 821–828, 2018.

MENÉNDEZ-ARIAS, L. *et al.* Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 177, n. 1, p. 159–66, 1988.

MENEZES, S. P. *et al.* Evaluation of the allergenicity potential of TcPR-10 protein from *Theobroma cacao*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, 2012.

MINKIEWICZ, P.; SOKOLOWSKA, J.; DAREWICZ, M. The Occurrence of Sequences Identical with Epitopes from the Allergen Pen a 1.0102 Among Food and Non-Food Proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 65, n. 1, p. 21– 29, 2015.

MITTAG, D. *et al.* A novel approach for investigation of specific and cross-reactive IgE epitopes on Bet v 1 and homologous food allergens in individual patients. *Molecular Immunology*, v. 43, n. 3, p. 268–278, 2006.

MONSALVE, R. I. *et al.* Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j IE: detection of an allergenic epitope. *The Biochemical journal*, v. 293 ( Pt 3, p. 625–32, 1993.

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



MORONTA, J. *et al.* The anti-inflammatory SSEDIKE peptide from Amaranth seeds modulates IgE-mediated food allergy. *Journal of Functional Foods*, v. 25, p. 579–587, 2016.

MOUSAN, G.; KAMAT, D. Cow's Milk Protein Allergy. *Clinical Pediatrics*, v. 55, n. 11, p. 1054–1063, 2016.

MUELLER, G. A. Contributions and Future Directions for Structural Biology in the Study of Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 174, n. 2, p. 57–66, 2017.

NAGHIBI, B.; RAYATNIA, F. Co-Administration of Subeffective Anxiolytic Doses of Diazepam and Hydroxyzine in Elevated Zero-Maze in Mice. 2011.

NAKAMURA, R.; TESHIMA, R. ScienceDirect Proteomics-based allergen analysis in plants ☆. *Journal of Proteomics*, v. 93, p. 40–49, 2013.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 100, n. 4, p. 656–664, 2012.

NOWAK-WE, A.; SAMPSON, H. A. Future therapies for food allergies. p. 558–573, 2013.

OBAYASHI, Y.; NAGAMURA, Y. Does monosodium glutamate really cause headache ? : a systematic review of human studies. *The Journal of Headache and Pain*, p. 0–6, 2016.

OFFERMANN, D. A. *et al.* Synthesis and incorporation into cyclic peptides of tolan amino acids and their hydrogenated congeners: Construction of an array of A-B-loop mimetics of the Cε3 domain of human IgE. *Journal of Organic Chemistry*, v. 77, n. 7, p. 3197–3214, 2012.

OGUNNIYI, D. S. Castor oil: A vital industrial raw material. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 9, p. 1086–1091, 2006.

OLIVEIRA, N. D. DE; LIMA, O.; MACHADO, T. Allergens and Toxins from Oleaginous Plants : Problems and Solutions. *Population (English Edition)*, 2010.

OZDEMIR, C. *et al.* Mechanisms of Aeroallergen Immunotherapy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v. 36, n. 1, p. 71–86, 2016.

PANTOJA-UCEDA, D. *et al.* Solution structure of a methionine-rich 2S albumin from sunflower seeds: Relationship to its allergenic and emulsifying properties. *Biochemistry*, v. 43, p. 6976–6986, 2004.

PAPADOPOULOS, N. Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. *Clinical and Translational Allergy*, v. 2, p. 21, 2012.

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

POINT, W.; AALBERSE, R. C. Structural biology of allergens. p. 228–238, [s.d.].

PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R. J. N-Methyl-D-aspartate Receptors: Subunit Assembly and Trafficking to the Synapse. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 11, p. 9673–9676, 2004.

REINMUTH-SELZLE, K. *et al.* Air Pollution and Climate Change Effects on Allergies in the Anthropocene: Abundance, Interaction, and Modification of Allergens and Adjuvants. *Environmental Science and Technology*, v. 51, n. 8, p. 4119–4141, 2017.

RESTANI, P. *et al.* Cross-reactivity between mammalian proteins. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, v. 89, n. 6 SUPPL. 1, p. 11–15, 2002.

RING, J.; GUTERMUTH, J. 100 years of hyposensitization: History of allergenspecific immunotherapy (ASIT). *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 66, n. 6, p. 713–724, 2011.

ROBOTHAM, J. M. *et al.* Ana o 3 , an important cashew nut ( *Anacardium occidentale* L . ) allergen of the 2S albumin family. p. 1284–1290, [s.d.].

ROBOTHAM, J. M. *et al.* Linear IgE epitope mapping of the English walnut (*Juglans regia*) major food allergen, *Jug r 1*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 109, n. 1, p. 143–149, 2002.

RUGGIERO, R. N. *et al.* Otr ansmiissão g Neurotr otransmiissão glutama lutamatér térgica Neur lutama tér gica e plasticidade sináptica : aspectos mo- leculares es , clínicos filo ilog lecular es , c línicos e f ilo g enéticos. *Medicina*, v. 44, n. 2, p. 127–140, 2011.

SANDOMENICO, A. *et al.* IgE-binding properties and selectivity of peptide mimics of the Fc  $\gamma$  RI binding site. v. 46, p. 3300–3309, 2009.

SARINHO, E.; CRUZ, Á. A. Anti-IgE monoclonal antibody for the treatment of asthma and other manifestations related to allergic diseases. *Jornal de Pediatria*, v. 82, n. SUPPL. 2, p. 127–132, 2006.

SCHEIN, C. H.; IVANCIUC, O.; BRAUN, W. Common physical-chemical properties correlate with similar structure of the IgE epitopes of peanut allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 22, p. 8752–8759, 2005.

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

SHARMEN, F. *et al.* Investigation of in vivo neuropharmacological effect of *Alpinia nigra* leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 4, n. 2, p. 137–142, 2014.

SHEEHAN, W. J.; GARDYNSKI, A.; PHIPATANAKUL, W. Skin testing with water buffalo's milk in children with cow's milk allergy. *Pediatric Asthma, Allergy and Immunology*, v. 22, n. 3, p. 121–125, 2009.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 133, n. 2, p. 291- 307.e5, 2014.

SILVA, J. G. DA *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.

SIMONS, F. E. R.; SIMONS, K. J. H1 antihistamines: current status and future directions. *The World Allergy Organization journal*, v. 1, n. 9, p. 145–55, 2008.

SKRIPAK, J. M. *et al.* The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 120, n. 5, p. 1172–1177, 2007.

SMALDINI, P. L. *et al.* Down-regulation of NF- $\kappa$ B signaling by *Gordonia bronchialis* prevents the activation of gut epithelial cells. *Innate Immunity*, v. 20, n. 6, p. 626–638, 2014.

TANABE, S. Epitope Peptides and Immunotherapy. *Current Protein & Peptide Science*, v. 8, n. 1, p. 109–118, 2007.

TANG, M. L. K.; MULLINS, R. J. Food allergy : is prevalence increasing ? 2017.

THAKUR, V. D.; MENGI, S. A. Neuropharmacological profile of *Eclipta alba* ( Linn .) Hassk. v. 102, n. March, p. 23–31, 2005.

THORPE, S. C.; KEMENY, D. M.; PANZANI, R. Allergy to castor bean to common I . Its relationship to sensitization inhalant allergens ( atopy ). [s.d.].

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.

VANDENPLAS, Y. *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Archives of Disease in Childhood*, v. 92, n. 10, p. 902–908, 2007.

\_\_\_\_\_. Prevention of allergic sensitization and treatment of cow's milk protein allergy in early life: The middle-east step-down consensus. *Nutrients*, v. 11, n. 7, 2019.

VERHASSELT, V. Oral tolerance in neonates: From basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunology*, v. 3, n. 4, p. 326–333, 2010.

WAL, J.-M. Cow's milk allergens. *Allergy*, v. 53, n. 11, p. 1013–1022, 1998.

WALD, M. *et al.* Hypoallergenic mutants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5 generated by proline mutations. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 159, n. 2, p. 130–142, 2012.

WANG, J.; SAMPSON, H. A. Science in medicine Food allergy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 3, p. 827–835, 2011.

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.

WARD, DANA E. *et al.* Chimeric antigen receptors based on low affinity mutants of FcεRI Re-direct T cell specificity to cells expressing membrane IgE. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. OCT, p. 1–11, 2018.

WARD, DANA E *et al.* Chimeric Antigen Receptors Based on Low Affinity Mutants of Fc ε RI Re-direct T Cell Specificity to Cells Expressing Membrane IgE. v. 9, n. October, p. 1–11, 2018.

WERNICK, N. L. B. *et al.* Cholera toxin: An intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. *Toxins*, v. 2, n. 3, p. 310–325, 2010.

WOESSNER, K. M.; SIMON, R. A.; STEVENSON, D. D. Monosodium glutamate sensitivity in asthma. v. m, p. 305–310, [s.d.].

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

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*, v. 64, n. 4, p. 295–303, 2015.

XU, W. *et al.* Genomic analysis reveals rich genetic variation and potential targets of selection during domestication of castor bean from perennial woody tree to annual semi-woody crop. *Plant Direct*, v. 3, n. 10, p. 1–16, 2019.

YOULE, R.; HUANG, A. Occurrence of Low Molecular Weight and High Cysteine Containing Albumin Storage Proteins in Oilseeds of Diverse Species. *American Journal of Botany*, v. 68, n. 1, p. 44–48, 1981.

ZHANG, K. *et al.* Blocking Allergic Reaction through Targeting Surface-Bound IgE with Low-Affinity Anti-IgE Antibodies. *The Journal of Immunology*, v. 198, n. 10, p. 3823–3834, 2017.

ZIELLO, C. *et al.* Changes to airborne pollen counts across europe. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, 2012.