

**Albumina 2S de *Jatropha curcas* L.: caracterização
estrutural e mapeamento de epitopos ligantes de IgE**

LÍVIA MAIA CRESPO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
DEZEMBRO - 2013

Albumina 2S de *Jatropha curcas* L.: caracterização estrutural e mapeamento de epitopos ligantes de IgE

LÍVIA MAIA CRESPO

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro para obtenção de grau de mestre em Biociências.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
DEZEMBRO - 2013**

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 Dr^a. Olga Lima Tavares Machado.

Financiamentos:

- FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).

- CNPq (Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e tecnológico)

- FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos)

Albumina 2S de *Jatropha curcas* L.: caracterização estrutural e mapeamento de epitopos ligantes de IgE

LÍVIA MAIA CRESPO

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro para obtenção de grau de mestre em Biociências.

Banca Examinadora:

Dr. Milton Masahiko Kanashiro (LBR/CBB/UENF)

Dr. Renato Augusto DaMata/UENF (LBCT/CBB/UENF)

Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges (LGE/CCS/UFRJ)

Dr^a. Olga Lima Tavares Machado UENF (LQFPP/CBB/UENF)
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação é uma experiência enriquecedora e de plena superação. Nos modificamos a cada tentativa de buscar respostas às nossas aflições de 'pesquisador'. Para aqueles que compartilham conosco desse momento, parece uma tarefa interminável e enigmática que só se torna realizável graças a muitas pessoas que participam, direta ou indiretamente. E é a essas pessoas que gostaria de agradecer:

A orientadora Dr.^a Olga L. Tavares Machado, quem muito admiro e tenho como referência profissional e pessoal, agradeço pela compreensão, estímulo, dedicação, paciência, conselhos e observações;

A Dr.^a Natália Deus de Oliveira, por toda troca de conhecimento e experiências, pelos conselhos e ajuda;

Ao Fábio Maciel (*in memoriam*), exemplo de dedicação e entrega a pesquisa, pela paciência ao me ensinar. Dar seguimento ao seu trabalho foi uma honra;

Ao revisor deste trabalho, professor Dr. André de Oliveira Carvalho, pela atenção, dedicação e profissionalismo dispensados na revisão deste trabalho;

Aos amigos do LQFPP que tanto me apoiaram, me ensinaram, agradeço por todas as dicas e ajuda;

Aos professores da pós-graduação em Biociência e Biotecnologia, que através da sublime arte de ensinar contribuíram para o enriquecimento do meu conhecimento ofereço meus sinceros agradecimentos;

Ao meu marido Fabrício, por todo apoio nos momentos difíceis, incentivo, carinho, compreensão e companheirismo;

Aos meus pais por todo estímulo e por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e de vitória. Pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicionais. A vocês, minha eterna gratidão;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao Criador, por ter-me concedido à graça de mais uma vitória.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José Alencar).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO: Características da <i>Jatropha curcas</i> L. (pinhão-manso)	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Alérgenos de plantas.....	6
2.1.1.1 Superfamília Cupin	7
2.1.1.2 Família Bet v1.....	7
2.1.1.3 Superfamília prolamínas	8
2.1.1.3.1 Albumina 2S.....	8
2.1.1.3.1.1 Albumina 2S de <i>Jatropha curcas</i> L.....	9
2.2 Hipersensibilidade.....	9
2.2.1 Alergia desencadeada por Albumina 2S.....	10
2.2.2 Mastócitos	12
2.2.3 Anticorpos IgE	13
2.2.3.1 Epitopos ligantes de IgE.....	14
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 MATERIAL E MÉTODO	17
4.1 Material biológico: obtenção e manutenção	17
4.2 Obtenção de albumina 2S de sementes de <i>J. curcas</i>.....	18
4.2.1 Extração de proteínas da semente de <i>J. curcas</i>	18
4.3 Purificação das albuminas 2S de <i>J. curcas</i> (Jat c1)	19
4.3.1 Cromatografia de exclusão molecular.....	19
4.3.2 Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema de alta eficiência	19
4.3.3 Dosagem de proteínas	19
4.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	19
4.3.5 Determinação da massa molecular da albumina 2S de pinhão-manso por espectrometria de massa	20
4.4 Caracterização da estrutura primária parcial da albumina 2S	20
4.4.1 Separação das cadeias de Jat c1: Desnaturação, redução e alquilação.	20
4.5 Determinação da sequência de aminoácidos da isoforma majoritária de albuminas 2S de <i>J. curcas</i>	21
4.6 Estudo de epitopos contínuos em albumina 2S de <i>J. curcas</i>	21
4.6.1 Obtenção de soro anti-albumina 2S.....	21
4.6.2 Verificação de capacidade ligante de anticorpos específicos contra albumina 2S de pinhão por ELISA (do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	22
4.6.3 Avaliação de resposta-cruzada entre o anticorpo anti-Alb 2S de mamona e albumina 2S de <i>J. curcas</i>	23
4.6.4 Ensaio para avaliação da atividade alérgica por desgranulação de mastócito..	23
4.6.4.1 Obtenção de Mastócitos.....	23
4.6.4.2 Lavagem peritoneal.....	23
4.6.4.3 Separação por sedimentação em placa de Petri	23
4.6.5 Avaliação da resposta dos mastócitos às cadeias leve e pesada da albumina 2S de <i>J. curcas</i>	23

4.7 Investigação de aminoácidos de Jat c1 envolvidos na interação com a IgE.....	24
4.7.1 Desenho dos peptídeos.....	24
4.7.2 Determinação da homogeneidade dos peptídeos sintetizados	25
4.7.3 Síntese de peptídeos modificados	25
4.7.4 Avaliação da atividade alergênica para investigação de possíveis epitopos ligantes de IgE de albumina 2S de <i>J. curcas</i>	25
4.7.5 Modificações em resíduos de ácidos glutâmicos	26
4.8 Estudos de modelagem por homologia	26
4.8.1 Alinhamento de estrutura primária e predição de estrutura secundária	26
4.8.2 Modelagem por homologia de Jat c1 e processamento de Ric c 3	27
4.8.3 Modelagem de Jat c1 e peptídeos após substituições de resíduos de ácido glutâmico por leucina.....	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Purificação de Albumina 2S de sementes de <i>J. curcas</i>.....	28
5.1.1 Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular:.....	28
5.1.2 Fracionamento da F2 por cromatografia de fase reversa (C18- HPLC):	29
5.1.3 Eletroforese em gel de policrilamida	30
5.1.4 Análise da massa molecular por espectrometria.....	31
5.2 Caracterização da estrutura primária parcial da albumina 2S de <i>J. curcas</i>.....	32
5.2.1 Separação das cadeias da albumina 2S de <i>J. curcas</i> (Jat c1)	32
5.3 Determinação da sequência de aminoácidos da isoforma majoritária de albuminas 2S de <i>J. curcas</i> (Jat c1).....	33
5.4 Estudo de epitopos contínuos em albumina 2S de <i>J. curcas</i>	34
5.4.1 Verificação de capacidade ligante de anticorpos específicos contra albumina 2S de <i>J. curcas</i>	34
5.4.2 Avaliação de resposta-cruzada entre o anticorpo anti-Alb 2S de <i>R. communis</i> (mamona) e a albumina 2S de <i>J. curcas</i>	35
5.4.3 Ensaio para avaliação da atividade alergênica	36
5.5 Investigação de aminoácidos de Jat c1 envolvidos na interação com a IgE.....	37
5.5.1 Desenho de peptídeos sintéticos.....	37
5.5.2 Análise da homogeneidade dos peptídeos sintéticos de <i>J. curcas</i>	38
5.6 Avaliação da atividade alergênica para investigação de possíveis epitopos de Jat c1 ligantes de IgE.....	39
5.6.1 Ensaio de desgranulação de mastócitos dos peptídeos sintéticos.....	39
5.6.2 Avaliação sobre a importância de aminoácidos ácidos na interação com a molécula IgE.....	39
5.6.2.1 Modificações em resíduos ácidos de peptídeos sintéticos	39
5.6.2.1.1 Avaliação da atividade alergênica de peptídeos tratados com reagente bloqueador de grupamentos carboxílicos	41
5.6.2.2 Síntese de peptídeos modificados (Glu X Leu).....	43
5.6.2.2.1 Avaliação da atividade alergênica de peptídeos modificados	43
5.7 Modelagem Molecular.....	44
5.7.1 Alinhamento de estrutura primária e predição de estrutura tridimensional	44
5.7.2 Modelagem de Jat c1 e peptídeos após substituições de resíduos de ácido glutâmico por leucina.....	46
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema das partes de <i>Jatropha curcas</i> L.	2
Figura 2: Frutos maduros e sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. em cortes longitudinais.....	3
Figura 3: Sequência N-terminal de Jat c1.....	9
Figura 4: Ilustração mostrando um mastócito ativado pelo acoplamento cruzado do antígeno aos receptores IgE de sua membrana celular	11
Figura 5: Estrutura primária do precursor das albuminas 2S de <i>Ricinus communis</i> L.	15
Figura 6: Esquema do método de extração de albumina 2S das semente de <i>J. curcas</i>	18
Figura 7: Reação do reagente Woodward's K (WRK) frente ao grupamento carboxílico.....	26
Figura 8: Perfil cromatográfico de exclusão molecular (Sephadex G-50) do extrato bruto de sementes de <i>J. curcas</i>	28
Figura 9: Perfil cromatográfico da albumina 2S de pinhão-manso após cromatografia de fase reversa em coluna C18	29
Figura 10: Visualização eletroforética de frações ricas em albuminas 2S obtidas de <i>J. curcas</i> em gel de poliacrilamida 15 % na presença de SDS.....	30
Figura 11: Massa molecular de Jat c1 determinada por espectrômetria de massas.....	31
Figura 12.1: Cromatograma da albumina 2S de pinhão-manso purificada após tratamento de redução e alquilação das pontes dissulfeto após cromatografia de alta eficiência de fase reversa em coluna C18.	33
Figura 12.2: Cromatograma das cadeias leve e pesada, previamente separadas, de albumina 2 S de <i>J. curcas</i> em cromatografia de alta eficiência de fase reversa em coluna C2C18	33
Figura 13: Capacidade de ligação de anticorpos específicos gerados contra albumina 2S de pinhão-manso em camundongos e ratos com albumina 2S purificada de <i>J. curcas</i>	34
Figura 14: Capacidade de ligação cruzada entre o anticorpo policlonal anti-albumina 2S de <i>R. communis</i> produzido em coelho com a albuminas 2S purificada de <i>J. curcas</i>	35
Figura 15: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato tratados com as cadeias leve (CL) e pesada (CP), previamente separadas, da albumina 2S de <i>J. curcas</i>	36
Figura 16: Fotomicrografia de mastócitos do lavado peritoneal de rato corados por azul de toluidina	37
Figura 17: Cromatograma dos peptídeos sintéticos P1, P3, P4, P5, P6 e P8 em cromatografia de alta eficiência coluna de fase reversa	38
Figura 18: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato frente aos peptídeos sintéticos.....	39
Figura 19: Cromatogramas dos peptídeos P1, P3, P5, P6 e P8 tratados com o reagente WRK (N-etil-5-fenilisoazolium-3`-sulfonato) e seus respectivos cromatogramas em coluna C18	40
Figura 20: Percentual de desgranulação de mastócitos frente aos peptídeos sintéticos tratados e não tratados com WRK	42
Figura 21: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato incubados com peptídeos sintéticos que tiveram ácidos glutâmicos substituídos por leucinas e seus respectivos controles44	
Figura 22: Representação esquemática tridimensional da albumina 2S de <i>J. curcas</i>	45
Figura 23: Identificação de aminoácidos na estrutura tridimensional de Jat c1.....	47
Figura 24: Representação esquemática tridimensional dos peptídeos e sua identificação na estrutura de Jat c1	49

RESUMO

Jatropha curcas L. (pinhão-mansão) é uma planta de origem provável no México e América Central, e que apresenta algumas semelhanças com a mamona. Ambas são euforbiáceas oleaginosas e apresentam alérgenos pertencentes à família das albuminas 2S já foram caracterizados. As albuminas 2S são proteínas de reserva presentes em sementes de diversas plantas. O reconhecimento de epitopos alergênicos é de fundamental importância para a elaboração de novas estratégias para a desativação de alérgenos e para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da alergia. O objetivo deste estudo foi elucidar possíveis epitopos ligantes de IgE em albuminas 2S de *J. curcas*. A extração da proteína Jat c 1, um alérgeno presente nas sementes de *J. curcas*, seguiu a metodologia descrita por Maciel *et al.*, (2009). A proteína Jat c 1 foi isolada por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-50), seguido de cromatografia de fase reversa em coluna C2C18. A estrutura primária parcial da albumina 2S foi elucidada empregando o sequenciamento automático e a partir dela a completa sequência gênica foi obtida por busca em banco de dados de proteínas, desta estrutura peptídeos foram sintetizados (P1, P4, P3, P5, P6 e P8). Com base nos conhecimentos prévios que as albuminas 2S de *R. communis* possuem aminoácidos ácidos (Glutâmico [E] ou Aspártico [D]) na constituição dos seus epitopos alergênicos, buscamos os mesmos aminoácidos na estrutura primária de *J. curcas*. Peptídeos foram tratados com reagente Woodward's K (WRK), um composto que reage com o grupamento carboxílico destes aminoácidos, e o potencial alergênico destes peptídeos foi investigado por ensaios de desgranulação de mastócitos de rato. Para comprovar o papel destes aminoácidos, peptídeos foram sintetizados com substituições de aminoácidos ácidos por leucinas (P1Leu, P3Leu, P5Leu, P6Leu e P8Leu). Foi possível observar que os peptídeos modificados e as amostras tratadas com WRK apresentaram menor percentual de desgranulação comparada a amostra inicial. Imunoensaios (ELISA) possibilitou detectar e quantificar a capacidade ligante de anticorpos específicos contra Jat c 1. Estudos de modelagem molecular foram empregados para identificar os peptídeos na estrutura tridimensional de Jat c 1. Nossos resultados apontam para a participação de aminoácidos dicarboxílicos na formação de epitopos nas albuminas 2S de *J. curcas*. O reconhecimento de epitopos alergênicos é de fundamental importância para o desenvolvimento de futuras vacinas e agentes farmacológicos, deste modo, maiores estudos com relação à estrutura-função de albuminas 2S de *J. curcas* necessitam de especial atenção.

Palavras-chave: albumina 2S, alergia, epitopo, Jat c 1, *Jatropha curcas* L.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. is a plant of origin likely in Mexico and Central America and it presents some similarities with castor oil. Both are oilseed Euphorbia and allergens belonging to the family of 2S albumin have been already characterized. The 2S albumin are storage proteins present in seeds of various plants. The recognition of allergen epitopes is of fundamental importance to the development of new strategies for the elimination of allergens and the development of new drugs for the treatment of allergy. The aim of this study was to elucidate possible IgE-binding epitopes in 2S albumin from *J. curcas*. The extraction of protein Jat c 1, an allergen present in the seeds of *J. curcas*, followed the methodology described by Maciel *et al.* (2009). Jat c 1 protein was isolated by size exclusion chromatography (Sephadex G-50) followed by reversed-phase chromatography in a C2C18 column. The partial primary structure of the 2S albumin was elucidated employing the automatic sequencing and from it the complete sequence was obtained by search in protein databank. From this primary structure were synthesized peptides (P1, P3, P4, P5, P6 and P8). Based on the prior knowledge that the 2S albumin from *Ricinus communis* possess amino acids (Glutamic [E] or Aspartic [D]) in the constitution of their allergenic epitopes, we seek the same amino acids in the primary structure of *J. curcas*. Peptides were treated with Woodward's Reagent K (WRK) a compound that reacts with the carboxylic acid grouping of these amino acids and potential allergenic of these peptides was investigated by testing the degranulation of rat mast cells. To prove the role of these amino acids, peptides were synthesized with amino acid substitutions of leucine (P1Leu, P3Leu, P5Leu, P6Leu e P8Leu). It was observed that the modified peptides and samples treated with WRK had a lower degranulation percentage compared to the initial sample. Immunoassays (ELISA) were done and allowed to detect and quantify the binding capacity of specific antibodies against Jat c 1. Molecular modeling studies were employed to identify the peptides in the three-dimensional structure of Jat c 1. Our results point to the involvement of dicarboxylic amino acids in the formation of epitopes on the 2S albumin from *J. curcas*. The recognition of allergen epitopes is crucial for the development of future vaccines and pharmacological agents, therefore further studies regarding the structure and function of albumin 2S from *J. curcas* need special attention.

Keywords : 2S albumin , allergy , epitope , Jat c 1 , *Jatropha curcas* L.

1 INTRODUÇÃO: Características da *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso)

Jatropha curcas L. pertence à família das Euforbiáceas. No Brasil possuem vários nomes vulgares como: pinhão-de-purga, pinhão-branco e pinhão-da-índia. *J. curcas* é cultivado em diversas partes do mundo, durante muitos anos, destacando-se o cultivo na Índia e na Tailândia. *J. curcas* é uma planta perene, tendo longevidade superior a 50 anos (CARVALHO, *et al.* 2009). Trata-se de uma planta que pode ser cultivada em qualquer tipo de solo, tanto em solos pobres e solos férteis, adapta-se bem a variações de pluviosidade (300 a 1000 mm) e vegeta muito bem em áreas com temperatura média entre 20 a 28°C. Em período de seca perde a folhagem e em estação chuvosa prolongada podem ocorrer dois períodos de florescimento. Produz colheitas durante um período de seis meses por ano e apresenta porte ideal para colheita e sua produção de grãos por hectare possui excelente rendimento. Adicionalmente, a semente de *J. curcas* apresenta elevado teor de óleo em suas sementes que possui importante aplicação industrial, incluindo a produção de biocombustível. Por essa e outras características é importante incrementar o seu emprego no meio rural como fonte geradora de renda (NITHIYANANTHAM *et al.*, 2012).

J. curcas pode ser encontrado sob a forma arbustiva ou como uma pequena árvore. Esta pode alcançar cerca de 5 metros de altura. Suas folhas são lobuladas (5-7 lóbulos), arranjasdas alternadamente e possuem de 6 a 15 cm de comprimento e largura (Figura 1) (HELLER, 1996). Após a polinização da flor, desenvolve-se um fruto elipsoidal trilocular (KARAJ e MÜLLER, 2010).

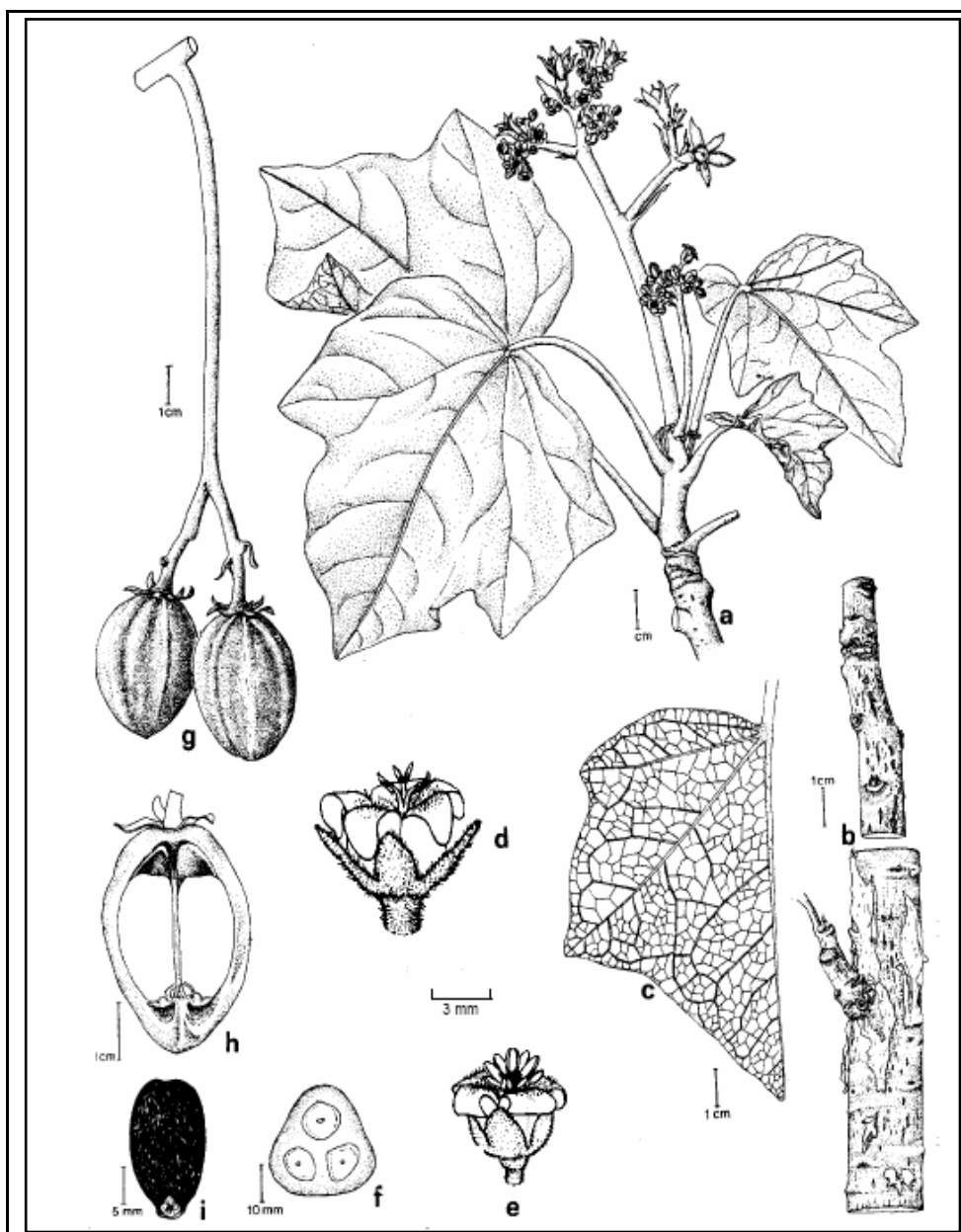


Figura 1 Esquema das partes de *Jatropha curcas* L.: a – ramo floral, b – caule, c – nervuras foliares, d – flor feminina, e – flor masculina, f – corte perpendicular de frutos imaturos, g - frutos, h – corte longitudinal do fruto, i – semente. (Adaptado de Heller, 1996).

As sementes de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansó) são negras, possuem 2 cm de comprimento e 1 cm de espessura. A carúncula da semente é bem pequena e de coloração branca (Figura 2). As sementes de *J. curcas* contêm entre 35 a 45% de óleo que pode ser utilizado na fabricação de sabão, na indústria cosmética, na fabricação de combustíveis alternativos que substituem o diesel e o querosene (ABDELGADIR *et al.*, 2008; HELLER, 1996).



Figura 2 – Frutos maduros e sementes de *Jatropha curcas* L. em cortes longitudinais. Disponível < http://www.ruralsementes.com.br/default.asp?tipo=1&secao=pinhao_manso.asp> acessado em 16/05/12.

O óleo de *J. curcas* também pode ser aplicado para o tratamento de eczema e doenças de pele, e no alívio de dores reumáticas. O alto conteúdo de ácido linoleico (36%, C18:2) é de grande interesse em tratamentos de pele e utilização em cosméticos (KUMAR e SHARMA, 2008; KAUSHIK *et al.*, 2007; HELLER, 1996).

J. curcas pode ser usada para prevenir e controlar a erosão, pode ser cultivada como cerca viva, fertilizante e pesticida. *J. curcas* também pode ser utilizada na alimentação animal, já que apresenta alto teor protéico, porém suas toxinas devem ser removidas (KING *et al.*, 2009; KUMAR e SHARMA, 2008).

Fagbenro-Beyioku em 1998 relatou a atividade anti-parasitária da seiva e de folhas esmagadas de *J. curcas*. No uso popular foi relatada a utilização da casca da raiz para cobrir feridas na pele, e o suco de folhas tratadas com cal ou limão para baixar a febre (KIRTIKAR e BASU, 1991).

Em partes da Ásia, foi relatado o uso popular da raiz de *J. curcas* como um antídoto para picada de cobra, e em regiões da África, houve relatos de *J. curcas* ter sido utilizada por mulheres para indução de abortos (MAKKAR *et al.*, 2009).

O efeito inseticida e fungicida de sementes de *J. curcas* e folhas têm sido investigadas (GUBITZ *et al.*, 1999). A casca da planta produz um corante azul-escuro, que é utilizado para colorir pano, redes e linhas de pesca (SINGH *et al.*; 2007).

Várias partes da planta apresentam valor medicinal, sua casca contém tanino, seus odores atraem as abelhas e, portanto, a planta tem um potencial importante na produção de mel; sua madeira e frutas podem ser utilizadas para inúmeros fins, incluindo o combustível, de particular importância (OPENSHAW, 2000).

A torta de pinhão-manso *in natura*, obtida após a extração do óleo das sementes, é tóxica e pode apenas ser utilizada como fertilizante, sendo esta rica em nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) (OPENSHAW, 2000).

A toxicidade das sementes é atribuída principalmente à presença de dois componentes: uma proteína inativadora de ribossomos denominada curcina e a ésteres diterpenos (GOEL *et al.*, 2007; ADOLF *et al.*, 1984). Os diterpenos são substâncias capazes de induzir tumores de pele quando administrados em camundongos (DEVAPPA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 1988; ADAM, 1974).

J. curcas está sendo considerada uma opção agrícola para a região nordeste brasileira por ser uma espécie que apresenta forte resistência à seca. Segundo Chierice e Neto (2007) é uma planta oleaginosa viável para a obtenção do biodiesel, pois produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare, levando de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que pode se estender por 40 anos. Com a possibilidade do uso do óleo do pinhão-manso para a produção do biodiesel, abrem-se amplas perspectivas para o crescimento das áreas de plantio com esta cultura no semi-árido nordestino (NITHIYANANTHAM *et al.*, 2012).

J. curcas apresenta algumas semelhanças com a mamona, ambas são euforbiáceas oleaginosas e estão sendo cogitadas para a produção de Biodiesel (ACHTEN *et al.*, 2008). A mamona apresenta em suas sementes e, também no pólen proteínas alergênicas bem caracterizadas, albuminas 2S, que limitam, em parte, o aproveitamento da torta e podem provocar crises alérgicas aos que cultivam esta planta ou residem próximo às plantações ou indústrias de processamento da semente. Devido a esta semelhança com a mamona e no potencial uso industrial de seu óleo e visando melhor estudar a presença de proteínas alergênicas em pinhão-manso, Maciel e colaboradores (2009) descrevem a presença de uma albumina 2S alergênica (12kDa), denominada Jat c 1, isolada das sementes de pinhão-manso. Neste trabalho, estamos propondo isolar e determinar a estrutura primária completa deste alérgeno e identificar os epitopos alergênicos.

Baseado na ascensão de custos com combustíveis fósseis, juntamente com o seu impacto negativo ao meio ambiente, a produção e uso de bioenergia está cada

vez mais em expansão (NITHIYANANTHAM *et al.*, 2012). Alergia à sementes de oleaginosas tem emergido como uma importante condição clínica através do aumento do uso de biodiesel, e devido ao risco à reações cruzadas de alérgenos (como observado para alérgenos de *J. curcas* e *R. communis*), os avanços na identificação e caracterização de alérgenos comuns e provenientes de sementes oleaginosas são necessários para o estabelecimento de uma terapia específica. Devido à presença de componentes alergênicos, o plantio, o processamento e a manipulação destas oleaginosas podem constituir riscos para a saúde do trabalhador rural que planta esta oleaginosa ou daquele que utiliza a torta como adubo em outras plantações; dos trabalhadores nas usinas de produção, bem como da população que reside próximo às áreas de plantio ou processamento da semente.

O biocombustível obtido a partir do óleo de *J. curcas* é considerado um combustível possível para substituir parte do diesel derivado do petróleo (BECKER e MAKKAR, 2008). Para que a extração do óleo de *J. curcas* seja atrativa é fundamental agregar valores à torta, um dos co-produtos produzidos após a extração do óleo. Esta torta poderá ser utilizada na produção de carvão ativado, fertilizantes, ração animal, e na produção de bioplástico (VYAS e SINGH, 2007; LESTARI *et al.*, 2011). A torta e a polpa dos frutos podem ser utilizadas ainda para a produção de biogás, proteínas extraídas da torta podem ser utilizadas na produção de adesivos, revestimentos e na produção de agentes tensoativos (NITHIYANANTHAM *et al.*, 2012; RAKSHIT *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2010; ADERIBIGBE *et al.*, 1997).

A crescente utilização de *J. curcas* e sua importância econômica vêm sendo descrita ao longo dos anos, porém problemas na sua aplicabilidade têm sido mostrados como sua toxicidade e capacidade alergênica (MAKKAR *et al.*, 2009). Deste modo é importante que se investigue a presença de componentes alergênicos e que se conheça a natureza química destes componentes. Estes conhecimentos são bases para o desenvolvimento de medidas para a prevenção da saúde do trabalhador, para processos de desativação dos componentes alergênicos, para que se agreguem valores à torta ou farelos produzidos, bem como para o desenvolvimento de imunoterápicos para o tratamento de indivíduos atópicos (MACHADO *et al.*, 2003). Este trabalho tem como foco os alérgenos, com as seguintes perguntas: Qual o envolvimento desta proteína na sensibilização de

indivíduos que estarão freqüentemente em contato com esta espécie? Os epitopos alergênicos de Jat c 1 são contínuos ou conformacionais? Quais aminoácidos dos epitopos alergênicos poderiam estar envolvidos na ligação com a imunoglobulina E (IgE)? Como que estas informações poderiam contribuir na elaboração de novas estratégias para a desativação de alérgenos?

A partir de dados obtidos neste trabalho esperamos gerar informações para a construção de um painel de epitopos alergênicos que poderá ser empregado na produção de vacinas baseadas em imunização com peptídeos sintéticos, minimizando os efeitos indesejáveis que são obtidos com o uso de alérgenos integrais ou com extrato de alérgenos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alérgenos de plantas

O termo alérgeno é utilizado para descrever duas ou três propriedades moleculares distintas: I) propriedade para sensibilizar (ou seja, induzir a produção de anticorpos de alta afinidade, em particular IgE, pelo sistema imune); II) propriedade de se ligar aos anticorpos IgE; III) propriedade para ativar uma reação alérgica (ou seja, disparar os sintomas alérgicos em pessoas sensibilizadas)(AALBERSE, 2000).

Muitos tecidos da planta que são consumidos pelos seres humanos contêm proteínas alergênicas. Aproximadamente 0,5% da população dos Estados Unidos é afetada por vários estágios de alergia devido à alérgenos de plantas (EL-AGAMY, 2007, BREITENEDER e RADAUER, 2004).

As sementes além de ser um órgão de propagação e de dispersão para a planta são também uma grande fonte de proteína na dieta humana (SHEWRY *et al.*, 1995). Por causa de sua abundância e importância econômica, as proteínas encontradas nas plantas são caracterizadas em grupos com base na sua extração e solubilidade em água (albuminas), diluição salina (Globulinas), misturas de álcool / água (prolaminas) e aquelas diluídas em ácido ou meio alcalino (glutelinas). As proteínas de reserva encontradas nas sementes incluem albuminas, globulinas e prolaminas (BREITENEDER e RADAUER, 2004; SHEWRY *et al.*, 1995). Alérgenos de plantas podem ser também proteínas que atuam na defesa, permitindo que a planta se defenda contra estresses bióticos e abióticos. Estes alérgenos são classificadas em famílias e superfamílias, com base na sua estrutura e função.

2.1.1 Classificação dos alérgenos de plantas

Alérgenos de plantas, assim como as proteínas de armazenamento ou relacionadas à defesa estão ligadas a três principais famílias / superfamílias: BetV1, a família profilina, cupin e superfamília das prolaminas (BREITENEDER e MILLS, 2005). Os alérgenos de plantas podem ser distribuídos em 31 famílias Pfam com 65% deles distribuídos nas 3 famílias mencionadas acima e a maioria dos membros das famílias restantes são proteínas alergênicas do sistema de defesa das plantas ou são proteínas relacionadas com patogênese (BREITENEDER e RADAUER, 2004).

As proteínas são agrupadas em famílias na qual possuem 30% ou mais de resíduos idênticos, caso apresentarem identidade de sequência inferior, estas são agrupadas em famílias quando suas funções e estruturas são muito semelhantes. Famílias cujos membros apresentam baixa homologia, mas as estruturas e características funcionais são semelhantes, estas são colocadas juntas em superfamílias (BREITENEDER e RADAUER, 2004).

2.1.1.1 Superfamília Cupin

Os cupins são uma superfamília funcionalmente diversa de proteínas que compartilham um domínio estrutural beta-barril, responsável pelo nome da família (latim *cupa*, barril). Compreendem as principais proteínas de reserva do tipo globulinas 7S tipo vicilina e globulina 11S tipo legumina (BREITENEDER e MILLS, 2005). Ambos os grupos apresentam uma variação considerável em suas estruturas, que resulta parcialmente do processamento pós-tradução, e são deficientes em cisteína e metionina (SHEWRY *et al.*, 1995). Essas proteínas são potenciais alérgenos encontrados em plantas, como amendoim, soja, lentilha, noz, avelã e algodão (BREITENEDER e RADAUER, 2004).

2.1.1.2 Família Bet v1

A maioria das reações alérgicas é causada por alérgenos de frutas de rosaceae, como por exemplo, maçã, cereja e pêra, e por vegetais da família apiaceae, como exemplos, cenoura e aipo, que apresentam reação cruzada com alérgenos em pólen de bétula, particularmente com o principal alérgeno Bet v1. O Bet v1 foi o primeiro de muitos alérgenos isolados que apresentou homologia com 10 famílias de proteínas relacionadas à patogênese. Esses alérgenos são muito instáveis ao aquecimento e à digestão (BREITENEDER e MILLS, 2005).

2.1.1.3 Superfamília prolaminas

A superfamília das prolaminas compreende o maior número de proteínas alergênicas de plantas, são compreendidas em três grupos principais de alérgenos de plantas: albuminas 2S, proteínas transportadoras de lipídeos não específicos (nsLTPs) e inibidores de alfa amilase/tripsina de sementes de cereais (BREITENEDER e RADAUER, 2004). Todas essas proteínas de baixo peso molecular são ricas em cisteínas (esqueleto conservado de oito resíduos), possuem dobras tridimensionais semelhantes que são ricas em alfa hélices e são estáveis ao processamento térmico e a proteólise.

2.1.1.3.1 Albumina 2S

A família de albuminas 2S tem sido descrita como uma família de proteínas muito estáveis à degradação proteolítica e à desnaturação térmica (SIRVENT *et al.*, 2012). As albuminas 2S apresentam coeficiente de sedimentação de aproximadamente 2S. Suas características estruturais estão bem determinadas. São proteínas pequenas (10-18) kDa, possuem altos teores de glutamina, arginina e serina, apresentam uma distribuição característica de oito cisteínas em um padrão conservado e geralmente composto de duas cadeias polipeptídicas diferentes ligadas por duas pontes de dissulfeto. Elas ainda apresentam duas ligações intracadeias, que as tornam proteínas muito estáveis e compactas (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2004)

Os ensaios de digestão *in vitro* dos membros desta família alergênica mostraram que a resistência à degradação gastrointestinal é uma propriedade em comum, e que poderia estar relacionada com a conformação de sua estrutura. Por isso, tem sido considerado que a conformação das proteínas alergênicas é um fator importante para a sua capacidade de resistir à degradação enzimática (SIRVENT *et al.*, 2012).

As albuminas 2S são sintetizadas no início do desenvolvimento da semente e depositadas dentro dos vacúolos (corpúsculos protéicos). Essas proteínas se acumulam durante o desenvolvimento da semente e são degradadas durante a germinação para dar suporte ao seu crescimento (REGENTE e DE LA CANAL, 2001). Elas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, como precursor protéico de alto peso molecular, produzindo, em geral, duas isoformas alergênicas (SHEWRY *et al.*, 1995).

Albuminas 2S são solúveis em água, são proteínas de reserva presentes nas sementes de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, incluindo leguminosas. Várias Albuminas 2S mostraram propriedades antimicrobianas e antifúngicas (AGIZZIO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2012).

2.1.1.3.1.1 Albumina 2S de *Jatropha curcas* L.

Maciel e colaboradores (2009), descreveram a presença de uma albumina 2S alergênica (12 kDa), chamada Jat c1 (Figura 3), isolada a partir de sementes de *J. curcas* L. A sequência parcial desta proteína foi determinada por estes autores.

Jat c 1
Cadeia Leve: VRDKCGEEAERRTLXGCENYISQRR
Cadeia Pesada: PREQVPRQCCNQALE

Figura 3. Sequência N-terminal de Jat c1.

Esta sequência N-terminal parcial apresentou semelhanças com albumina 2S de *Ricinus communis*, *Cucurbita maxima*, *Sesamum indicum*, *Solanum lycopersicum* e *Helianthus annuus*. A análise desta estrutura parcial evidenciou uma importante característica deste grupo de proteínas, a conservação dos quatro resíduos de cisteína.

Também foi demonstrado por Maciel *et al.*, (2009) a capacidade desta proteína alergênica de se ligar a IgE fixadas em mastócitos de ratos, induzindo a liberação de histamina. Suas propriedades alergênicas foram demonstradas pelo teste de anafilaxia cutânea passiva, uma reação alérgica do tipo I *in vivo*. Outra característica mostrada por Maciel e que a albumina 2S isolada a partir de *J. curcas* também mostraram reação cruzada com os principais alérgenos de *R. communis* (mamona), Ric c 1 e Ric c 3. Estes dados indicaram que um indivíduo sensibilizado a alérgenos de mamona (Ric c 1 e Ric c 3) pode tornar-se sensível a albumina 2S de *J. curcas* (Jat c 1) e que a condição inversa pode também ser possível.

2.2 Hipersensibilidade

A hipersensibilidade mediada por IgE, também referida como alergia alimentar, afeta estimadamente cerca de 4% das crianças (VENTER *et al.*, 2006) e até 4% dos adultos nos países ocidentais (SICHERER e SAMPSON, 2010). Embora a maioria das alergias alimentares causam reações leves, em alguns casos, podem ser fatais (SAMPSON, 2003). Cerca de 5% das crianças e 4% dos adultos sofrem de

algum tipo de resposta imune adversa aos alimentos. Nozes e sementes estão entre os alimentos mais alergênicos de origem vegetal (SICHERER e SAMPSON, 2010).

Os alérgenos que mais provocam sensibilizações através do trato gastrointestinal pertencem a família das prolaminas e à família cupin, (BREITENEDER e RADAUER, 2004). Isto ocorre porque são proteínas com uma alta resistência à desnaturação térmica ou degradação por peptidases (ASTWOOD *et al.*, 1996; PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2004). Embora exista alguma controvérsia, tem sido sugerido que a alergenicidade está ligada à estabilidade contra a digestão gastrointestinal. Neste contexto, uma forma imunologicamente ativa do alérgeno será capaz de atingir a mucosa intestinal onde a absorção e sensibilização poderá ocorrer. Portanto, os ensaios químicos de simulação da digestibilidade, utilizando fluido gástrico e simulações do fluido intestinal têm sido considerados como um instrumento útil para a avaliação do potencial de alergenicidade de certas proteínas (ASTWOOD *et al.*, 1996; PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2004; BANNON *et al.*, 2003).

2.2.1 Alergia desencadeada por Albumina 2S

Alergia desencadeada pela albumina 2S de *J. curcas* é classificada como imediata ou tipo I, é uma hipersensibilidade mediada por IgE, doença que afeta 25% da população mundial (FLOISTRUP *et al.*, 2006).

A sensibilização de um organismo se inicia com um primeiro contato de um antígeno, normalmente uma proteína, que induz alergia, sendo denominado alérgeno. Esta substância, ao penetrar no organismo por vias aéreas ou por outros tecidos, é encontrada por células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e/ou células dendríticas, que endocitam esta substância estranha, que são processadas por proteases a fragmentos; os fragmentos peptídicos gerados, também conhecidos como “epitopos de célula T” são direcionados para a membrana externa das células apresentadoras de antígenos, pelo complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II), na forma de um complexo, peptídeo-MHC II (ALEKSEEVA *et al.*, 2007; LICHTENSTEIN, 1993). Os linfócitos T auxiliares (Th 1 e/ou Th 2, do inglês *T helper*) reconhecem esses epitopos expostos e juntamente com os linfócitos B iniciam a resposta imunológica adquirida. A ativação de clones de células Th 2, específicas para o antígeno, é essencial para o desenvolvimento de doenças atópicas, pois estas células ativadas pelo contato com células apresentadoras de antígenos produzem quantidades relativamente grandes de citocinas, interleucinas 4 (IL-4) e 5 (IL-5), que podem, dentre outras funções,

atuar como sinais para a biossíntese de IgE pelos linfócitos B, que se associam aos receptores FcεRI que estão ligados na superfície dos mastócitos e basófilos (KAMBAYASHI e KORETZKY, 2007).

Numa subsequente exposição ao mesmo antígeno, conhecida como segunda sensibilização, expressiva resposta alérgica é observada. Após a interação do alérgeno com o tecido humano, ocorrerá ligação cruzada, na qual desencadeia uma ligação simultânea de anticorpos IgE (anteriormente ligadas aos receptores FcεRI nos mastócitos e/ou basófilos) com pelo menos dois epitopos do alérgeno (figura 4). Esta interação promoverá a ativação de mensageiros intracelulares e posterior liberação de mediadores celulares, como histaminas e prostaglandinas, que por sua vez induzirão mudanças fisiológicas e anatômicas que desencadearão os sintomas alérgicos da hipersensibilidade imediata (SEGAL *et al.*, 1977; ABBAS *et al.*, 2003; GIERAS *et al.*, 2007).

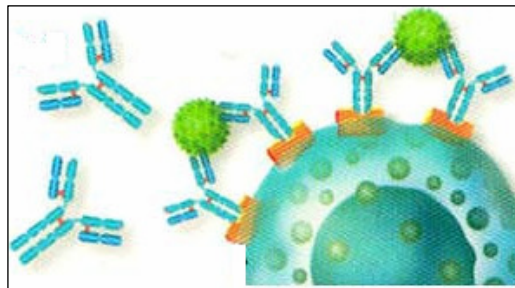


Figura 4: Ilustração mostrando um mastócito ativado pelo acoplamento cruzado do antígeno aos receptores IgE de sua membrana celular (Disponível<http://www.asma-bronquica.com.br/medical/inflamacao_alergica.html> Acessado em 19/09/12).

O evento de ligação cruzada inicia a liberação de mediadores inflamatórios, proteases e citocinas pró-inflamatórias de células efetoras e causa inflamação alérgica imediata, provocando os sintomas conhecidos da rinoconjuntivite alérgica, asma, alergias alimentares, inflamação da pele, e anafilaxia, esta última coloca o indivíduo sensibilizado em risco de vida (BISCHOFF, 2007).

Epitopos lineares ou contínuos de IgE são raros e têm sido descritos principalmente para alérgenos alimentares, o que pode ser devido ao fato de os alérgenos alimentares sofrerem proteólise no trato gastrointestinal, antes de induzir a produção de IgE e sensibilização de mastócitos. No entanto, tem sido mostrado que os alérgenos alimentares também podem conter epitopos conformacionais (GIERAS *et al.*, 2011; SCHULMEISTER *et al.*, 2009; VALENTA *et al.*, 2010).

Uma das propriedades biológica mais importante de anticorpo IgE é a capacidade de sensibilizar tecidos homólogos nas reações alérgicas. Anticorpos IgE podem sensibilizar não só a pele, mas também outros tecidos tais como mastócitos e basófilos presentes nos tecidos pulmonares. Os níveis de IgE são maiores em pacientes com ambas, dermatite atópica e alergia respiratória, do que naqueles com eczema pulmonar (HILLER *et al.*, 1997).

Pacientes com doenças atópicas, incluindo rinite alérgica, dermatite, asma alérgica, e dermatite atópica, comumente têm níveis moderadamente elevados de IgE. Em alguns casos, mais notavelmente na rinite alérgica sazonal, estudos demonstraram uma significativa correlação positiva entre a quantidade de anticorpo IgE específico e a intensidade dos sintomas em pacientes alérgicos (ARNON e VAN REGENMORTEL, 1992).

2.2.2 Mastócitos

O mastócito é uma célula grande, globosa, derivada de progenitores presentes na medula óssea, e apresenta o citoplasma carregado de grânulos que se coram intensamente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). São células amplamente distribuídas pelos tecidos de mamíferos, especialmente nos espaços perivasculares e tecidos conectivos da pele, intestino, trato respiratório e gastrintestinal (BOYCE, 2003; LOUZADA *et al.*, 2003). Os mastócitos fazem parte do sistema imunológico inato e participam na primeira linha de defesa contra agentes patogênicos, tais como bactérias e parasitas. Tradicionalmente os mastócitos são considerados as maiores células efetoras associadas a IgE em respostas alérgicas tais como a asma. No entanto, recentemente pesquisas têm ampliado as funções dos mastócitos e seus papéis fisiopatológicos têm sido reconhecidos em diversas doenças (ANAND *et al.*, 2012).

Os mastócitos, assim como os basófilos, são ativados pela ligação cruzada das moléculas do FcεRI, causada pela ligação de antígenos multivalentes às moléculas IgE ligadas ao receptor. Em indivíduos não atópicos, as moléculas de IgE ligadas aos mastócitos são específicas para muitos antígenos diferentes, todos os quais podem induzir a produção de baixos níveis de IgE (ABBAS *et al.*, 2003).

A ativação dos mastócitos resulta em três respostas biológicas: I) secreção dos conteúdos pré-formados dos grânulos; II) síntese e secreção de mediadores lipídicos; e III) secreção de citocinas. As funções efetoras dos mastócitos são mediadas por moléculas solúveis liberadas das células sob ativação. Essas

moléculas solúveis podem ser divididas em mediadores pré-formados (que incluem as aminas biogênicas e as macromoléculas dos grânulos) e os mediadores recém-sintetizados, que incluem mediadores derivados de lipídeos e citocinas. Nos mastócitos humanos o único mediador da classe das aminas biogênicas é a histamina (ABBAS *et al.*, 2003).

Os mastócitos são células altamente granuladas, e estas são parcialmente ou completamente desgranuladas por uma grande variedade de estímulos imunológicos e não imunológicos (ANAND *et al.*, 2012).

Os grânulos desta célula inflamatória possuem como mediadores primários a histamina, serotonina, heparina, fatores quimiotáticos e várias proteases tais como a triptase, quimase, carboxidase e também peroxidase e beta glucuronidase (SCHWARTZ e AUSTEN, 1980). Além disso, a ativação de mastócitos gera mediadores secundários tais como as prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas e várias citocinas, tais como IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, fator de estimulação de colônia de macrófagos e granulócitos, proteína inflamatória dos macrófagos (MIP-1 β e 1 α) e TNF- α (ABBAS *et al.*, 2003).

Devido à síntese e liberação de diversos tipos de mediadores inflamatórios, os mastócitos pode produzir alterações fisiopatológicas em vários órgãos, levando o desenvolvimento de diferentes doenças (ANAND *et al.*, 2012).

2.2.3 Anticorpos IgE

As IgEs são mediadoras imunes cruciais de reações alérgicas e são responsáveis pela indução e manutenção dos sintomas alérgicos. No decurso de uma resposta imune alérgica, células B são estimuladas, e em conjunto com as IL-4 e IL-13, fornecida por células Th2, induzem a produção de anticorpos IgE (HEUSSER e JARDIEUT, 1997).

Anticorpos IgE agem em células que possuem receptores (Fc ϵ RI) de alta afinidade, tais como mastócitos, basófilos e células de Langerhans, ou a partir de células que apresentam receptores de baixa afinidade de IgE (Fc ϵ RII, CD23), tal como as células B, monócitos e outras células inflamatórias. Interação do alérgeno com a IgE, complexada ao receptor Fc ϵ RI de mastócitos e basófilos, desencadeia a liberação de uma variedade de mediadores farmacológicos, citocinas e quimiocinas (ABBAS *et al.*, 2003).

Desde a descoberta da função de IgE mais de duas décadas atrás, os cientistas consideraram várias estratégias que visam a inibição seletiva da ação e

produção de anticorpos IgE. Investigações tem incidido sobre o esclarecimento do mecanismo de controle da produção de IgE, incluindo os eventos moleculares de células B envolvidos na síntese de IgE (HELM *et al.*, 1989). Esforços para suprimir a ação de IgE por intermédio de modificação de alérgenos, de maneira a deslocar a resposta imune para IgG, assim como por peptídeos derivados de IgE para evitar a ligação do anticorpo IgE, tem encontrado sucesso, porém limitado (HELM *et al.*, 1989).

2.2.3.1 Epitopos ligantes de IgE

O termo epitopo foi introduzido por Jerne 50 anos atrás, quando o caracterizou como: configurações de superfície, temas estruturais, elementos imunogênicos, grupos haptênicos, padrões antigênicos, áreas específicas de um antígeno. Em diferentes livros a definição mais concisa logo se tornou “Menor porção do antígeno capaz de se ligar a uma receptor de células T” (JERNE, 1960). Determinante antigênico é geralmente considerado como sinônimo de "Epitopo". Embora a definição original de um epitopo foi estabelecida como interações antígeno-anticorpo, mais tarde foi aplicado também para descrever as interações entre células T e peptídeos reconhecidos pelo receptor de células T (AALBERSE *et al.*, 2011).

Westritschnig *et al.*, (2004) declararam que a totalidade da superfície de uma proteína é antigênica, mas esta não implica que cada parte da superfície é igualmente importante do ponto de vista do anticorpo. Alguns epitopos são reconhecidos com muito mais frequência do que outros. Pesquisas voltadas para estudos de epitopos apresentam certa relevância, pois as mesmas podem contribuir com a segurança e eficácia da imunoterapia específica, podem colaborar com informação importantes para o desenvolvimento de vacinas mais seguras baseadas em alérgenos. Estes estudos também poderão proporcionar informação sobre reações cruzadas entre diferentes alérgenos (AALBERSE *et al.*, 2011).

Abordagens para o desenvolvimento de novos tipos de vacinas, baseadas na utilização de moléculas alergênicas, têm sido desenvolvidas a partir de ensaios bem sucedidos de imunoterapia em pacientes alérgicos (DALL'ANTONIA *et al.*, 2011).

Vacinas à base de derivados de alérgenos, com reduzida atividade alergênica, prometem diminuir o risco de efeitos secundários no decurso de vacinação. O desenho destas vacinas é baseado na estrutura, e, por conseguinte,

as estratégias adotadas dependem fortemente da localização espacial e caracterização dos determinantes antigênicos (WESTRITSCHNIG *et al.*, 2004).

Nosso grupo de pesquisa vem, há mais de 20 anos investigando a natureza dos componentes alergênicos das sementes de oleaginosas, pertencentes à classe das albuminas 2S. Em trabalhos anteriores, nove isoformas de albuminas 2S de *Ricinus communis* foram caracterizadas, todas com propriedades alergênicas, em uma cultivar desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (MACHADO *et al.*, 2003). Nesta cultivar estavam presentes os dois principais alérgenos de mamona, Ric c 1 (LI, 2010) e Ric c 3 (MACHADO e SILVA, 1992; SILVA Jr. *et al.*, 1996). Ambos derivados de um mesmo precursor (Figura 5).

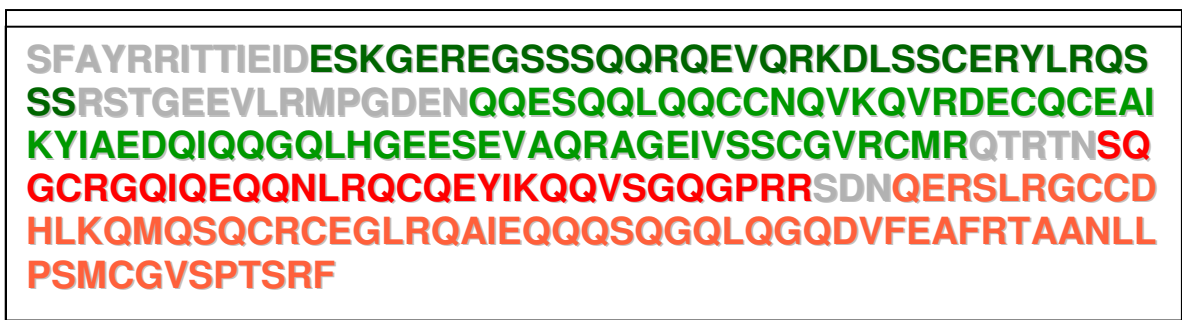


Figura 5: Estrutura primária do precursor das albuminas 2S de *Ricinus communis* L. Verde escuro e claro = cadeia leve e cadeia pesada de Ric c 3, respectivamente; Vermelho escuro e claro = cadeia leve e cadeia pesada de Ric c 1, respectivamente; Cinza = peptídeos que são eliminados durante o processamento entre as cadeias leves e pesadas.

Vieira (2002) demonstrou a presença de epitopos contínuos tanto em Ric c 1 como em Ric c 3, mais precisamente nas quatro cadeias polipeptídicas isoladas. Dois anos mais tarde, Mayerhoffer (2004) desenvolveu uma metodologia baseada em estudos de desgranulação de mastócitos que permitiu a identificação de um destes epitopos. Dando prosseguimento a estes estudos, FELIX *et al.*(2008) identificaram outros cinco epitopos, totalizando dois em Ric c 1 e quatro em Ric c 3. Carriello-Gama (2006) tratou as albuminas 2S, bem como os peptídeos sintéticos identificados como epitopos ligantes de IgE, com o reagente de Woodward's Reagent K (WRK, N-etil-5-fenilsoxazolium-3`-sulfonato), um reagente específico que se liga a grupamento carboxílicos. O material modificado não era mais reconhecido pelos mastócitos ativados com IgE anti-albuminas 2S de *R. communis*, não sendo portanto capaz de deflagrar a reação alérgica. Evidenciou-se deste modo a participação de resíduos de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e/ou aspártico) em

todos os epitopos analisados (patente depositada em novembro de 2005). O reagente WRK, não é economicamente viável para modificações em grande escala, mas foi, fundamental para demonstrar que o ácido glutâmico, presente nos epitopos alergênicos participava, de modo direto, no reconhecimento pela IgE (CARRIELO-GAMA, 2006).

Baseado nas informações adquiridas pelo grupo e a partir de dados que comprovam que a albumina 2S de *R. communis* apresenta reação cruzada com a albumina 2S de pinhão-manso, estudos sobre os epitopos de albumina 2S de pinhão-manso e a sua ligação com o anticorpo IgE fazem-se necessários. Os dados destes estudos poderão contribuir para o desenvolvimento de agentes farmacêuticos bloqueadores na molécula de IgE e, também ser utilizados para a produção de vacinas anti-alérgica baseada em peptídeos específicos. A utilização dos aminoácidos que participam efetivamente dos epitopos alergênicos e a aplicação da vacina peptídica específica poderão amenizar os problemas apresentados durante a hipossensibilização empregando os extratos brutos de alérgenos.

3 OBJETIVOS

O objetivo desta dissertação é a purificação, caracterização, elucidação da estrutura primária de Jat c 1 e identificação dos epitopos alergênicos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar proteínas do grupo das albuminas 2S de pinhão-manso;
- Sequenciar a proteína isolada;
- Investigar a presença de epitopos contínuos;
- Identificar epitopos ligantes de IgE em albuminas 2S de pinhão-manso;
- Avaliar quais aminoácidos dos epitopos alergênicos poderiam estar envolvidos na ligação com a imunoglobulina E.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material biológico: obtenção e manutenção

As sementes de *J. curcas* foram obtidas no Mato Grosso do Sul e mantidas sob temperatura ambiente em vidro âmbar. Os ratos RA/Thor e os camundongos Balb/c utilizados nos ensaios de alergenicidade, foram obtidos no próprio biotério da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Este trabalho foi autorizado pela Comissão de ética no Uso de Animais (anexo 1). A albumina 2S de *R. communis* purificada foi cedida pela Dr.^a Natália Deus de Oliveira da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Os anticorpos anti-albumina 2S de *J. curcas* e anti-albumina 2S de *R. communis* produzidos em ratos RA/Thor e camundongo Balb/c utilizados nos imunoenaios foram adquiridos em colaboração com o professor Dr. Maurício Afonso Veríssimo da Universidade Federal Fluminense. Os anticorpos anti-albumina 2S de *R. communis* produzidos em coelho (raça NZW) utilizado no ensaio de resposta cruzada de *R. communis* e *J. curcas* foram produzidos na própria universidade em colaboração com a Dr.^a Natália Deus de Oliveira.

4.2 Obtenção de albumina 2S de sementes de *J. curcas*

4.2.1 Extração de proteínas da semente de *J. curcas*

A metodologia descrita baseia-se na solubilidade das albuminas 2S em tampão fosfato pH 7,0, na precipitação das mesmas com sulfato de amônio e na resistência das mesmas ao aquecimento a 100° C por 15 min (THORPE, 1988).

As sementes de pinhão-manso foram descascadas manualmente, maceradas e em seguida, para retirada do óleo, foram embebidas em hexano (1:3, m/vol) sob agitação por 18 h. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 30 min, o sobrenadante foi descartado. Em seguida a massa obtida foi seca em temperatura ambiente até a obtenção de um farelo.

As proteínas do farelo obtido na etapa anterior foram então extraídas com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0, na proporção 1:4 (1g/4mL) durante 3 h sob agitação e em temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 14.000 g por 15 min a 8° C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido foi então precipitado com sulfato de amônio de 0 a 90% de saturação. A mistura foi então deixada em repouso por 16 h em 4° C. A seguir, o material foi centrifugado a 15.000 g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi ressuspenso em 10 mL água destilada e aquecido a 100°C por 15 min para precipitação de parte das proteínas. O aquecimento usado nesta etapa de purificação está baseado na resistência térmica das albuminas 2S conforme descrito por Thorpe (1988). Após a precipitação, a mistura obtida foi centrifugada a 3.000 rpm durante 15 min, o precipitado foi descartado e o sobrenadante contendo o extrato rico em albuminas 2S de pinhão-manso foi armazenado a -20° C para as análises posteriores (figura 6).

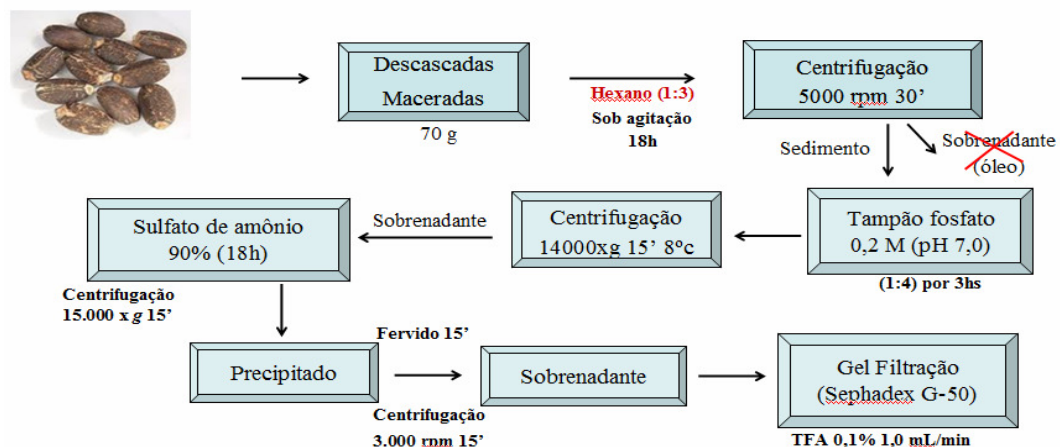


Figura 6: Esquema do método de extração de albumina 2S das semente de *J. curcas*.

4.3 Purificação das albuminas 2S de *J. curcas* (Jat c1)

4.3.1 Cromatografia de exclusão molecular

O extrato rico obtido na etapa anterior foi fracionado em coluna de sephadex G-50, utilizando tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.0, como fase móvel, sob um fluxo constante de 1 mL/min. O volume coletado por tubo foi de 1 mL e detectadas a 280 nm no espectrofotômetro (T70 UV/VIS *Spectrometer PG Instruments Ltd*). A fração de interesse foi concentrada por liofilização e armazenada a -20 °C para ser utilizada nas próximas etapas de purificação.

4.3.2 Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema de alta eficiência

A fração rica em albuminas 2S obtida na cromatografia de exclusão molecular foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C18, sob um fluxo constante de 0,7 mL/min em sistema de alta performance sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) da Shimadzu®, modelo LC-10AD (estação de trabalho "Class-LC10"). Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluor-acético (TFA) 0,1% em água (solução A) e Acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O gradiente utilizado foi: 10 min de solução A 100%; de 10 a 40 minutos a concentração da solução B foi elevada de 0 a 80% ; nos 5 min finais com solução A 100%. 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 secas num sistema speed-Vac.

4.3.3 Dosagem de proteínas

As proteínas deste material foram determinadas pelo método do ácido bicinrônico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985) e foram acumuladas, liofilizadas e guardadas a -20°C, em pequenas alíquotas para posteriores análises.

4.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em um sistema vertical Mini Protean III (BIORAD), sob uma corrente constante de 20 mA por gel. As amostras obtidas durante cada etapa do processo de extração e das etapas de purificação foram todas analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % na presença de SDS, segundo o método descrito por Laemmli (1970).

Os géis de poliacrilamida foram corados com uma solução de azul de coomassie R-250 0,1% em metanol 40% e ácido acético 10%. Posteriormente, os géis foram descorados com uma solução descorante composta de metanol 40% e ácido acético 10%.

4.3.5 Determinação da massa molecular da albumina 2S de pinhão-mansão por espectrometria de massa

Como avaliação complementar, análise por espectrometria de massas foi empregada utilizando o espectrômetro de massas modelo Synapt G2S Waters, em colaboração com o laboratório experimental da Waters em São Paulo. Os espectros de massas foram feitos em ciclos 0,6 segundos, alternando entre o ciclo de colisão de baixa energia (6V) e ciclos de colisão de alta energia (15 a 40 V).

4.4 Caracterização da estrutura primária parcial da albumina 2S

4.4.1 Separação das cadeias de Jat c1: Desnaturação, redução e alquilação.

As amostras (50 µg) obtidas nas cromatografias em coluna C18 foram tratadas com 200 µL de cloreto de guanidina 6 M em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,3 contendo 1 mM de EDTA por 2 h a 37°C, a fim de se desfazer as pontes de hidrogênio da proteína de interesse. Posteriormente, para redução das pontes de enxofre, a amostra foi tratada com DTT na concentração final de 4 mM. Nitrogênio gasoso foi passado sobre a mistura para eliminar a atmosfera de oxigênio e o frasco foi selado. O meio reacional foi incubado a 37°C por 1 h. Uma nova alíquota de DTT em uma concentração de 2 mM, foi adicionada e o meio foi incubado por mais 2 h a 37°C. A seguir foram adicionados 5 µL de 4-vilpiridina, para alquilar os resíduos de cisteínas, e o meio foi incubado por 2 h na ausência de oxigênio e de luz (Allen, 1989). O tratamento com 4-vilpiridina impede que as cisteínas reduzidas pelo DTT retornem à condição inicial de cistina (resíduos de cisteínas ligadas por pontes de enxofre) na proteína íntegra. Um branco de reação foi preparado pela substituição da amostra por água. Após o término das reações o branco e as amostras foram analisadas por cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema de alta eficiência. 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 100%; 10 a 40 minutos a concentração da solução B foi elevada de 0 a 80% ; nos 5 min finais com solução A 100%. As cadeias foram coletadas separadamente e repurificadas em cromatografia de fase reversa coluna

C2C18. Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluor-acético (TFA) 0,065% + 2% acetonitrila (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 100%; 10 a 40 minutos a concentração da solução B foi elevada de 0 a 100% ; nos 15 min finais com solução A 100%.

4.5 Determinação da sequência de aminoácidos da isoforma majoritária de albuminas 2S de *J. curcas*

Para determinar a sequência de aminoácidos das proteínas de interesse oriundas de processos cromatográficos, foi utilizado o processo de sequenciamento automático de aminoácidos (PPSQ-33, *Shimadzu*), empregando a metodologia desenvolvida por Edman (1950). A degradação de Edman é um processo cíclico onde os resíduos de aminoácidos são clivados um a um (a cada ciclo) a partir da região N-terminal da proteína, sendo identificados como derivativos fenil-tiodantoínas (PTH-AA). Cada ciclo é realizado em três etapas: acoplamento do fenil-isotiocianato (PITC) com o resíduo N-terminal, clivagem do resíduo N-terminal via ciclização em meio ácido, e conversão do derivado tiazolinona (AZT) formado em um derivado mais estável, a fenil-tiodantoína (PTH), o qual pode ser identificado por cromatografia de fase reversa em coluna C18, usando um sistema isocrático de acetonitrila (Allen, 1989).

4.6 Estudo de epitopos contínuos em albumina 2S de *J. curcas*

4.6.1 Obtenção de soro anti-albumina 2S

Os soros policlonais de ratos RA/Thor e camundongos Balb/c anti-albumina 2S de pinhão-manso foram produzidos na Universidade Federal Fluminense, em colaboração com o Dr. Maurício Afonso Verícimo. Para tanto, 10 ratos RA/Thor foram imunizados por injeção intraperitoneal de 0.5 mL de salina contendo 0.01 mg de Jat c 1 e 5.0 mg de hidróxido de alumínio. Após a primeira imunização, os animais receberam, um mês depois, uma dose reforço de antígeno. Neste caso, a mesma quantidade do antígeno foi misturada com 2.5 mg de hidróxido de alumínio. Os animais foram anestesiados e sangrados, por punção cardíaca, 7 dias após o reforço, sendo que volumes de soro iguais de cada animal foram recolhidos, reunidos e guardados em alíquotas de 0.1 mL. Essas alíquotas representaram o "pool" de soro policlonal de rato anti-albumina 2S que foi utilizado nos ensaios de

desgranulação. O soro policlonal de coelho anti-albumina 2S de *R. communis* foram produzidos na própria universidade e o mesmo método acima foi adotado.

4.6.2 Verificação de capacidade ligante de anticorpos específicos contra albumina 2S de pinhão por ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

A microplaca de 96 poços para ELISA (MaxiSorp, Nunc) foi sensibilizada com 1 µg de albumina 2S proveniente da semente de pinhão-manso (controle positivo), diluída em 100 µl de tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, durante 18 h, à 4 °C, as amostras testadas foram preparadas seguindo o mesmo modelo. Após o período de 18 h, a placa foi lavada duas vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (300 µl/poço durante 1 h). Em seguida, foi adicionados 300 µl de tampão bloqueador (1% de gelatina diluído em Tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) contendo 0,05% de Tween 20, permanecendo na placa por 1 h à 25 °C.

Após o bloqueio, a placa novamente foi lavada com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (300 µL/poço durante 1 h), e posteriormente, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo primário (soro policlonal anti-albumina 2S de pinhão-manso) produzido em rato por 2 h a 25 °C, diluído 1:500 em tampão bloqueador. Posteriormente, a placa foi novamente lavada com PBS contendo 0,05% de Tween 20, por três vezes durante 5 minutos e, em seguida, a placa foi incubada com o anticorpo secundário, anti-IgE de rato complexado a biotina, diluído 1:2.000 (50 µL por poço), por 1 h à 25 °C. Novamente a placa foi lavada com PBS contendo Tween, por três vezes de 5 min. Cada poço foi incubado com 50 ul da solução 1:1.000 em tampão bloqueador de estreptavidina conjugada à peroxidase, por 30 min, em seguida a placa foi lavada com PBS contendo Tween, por três vezes de 5 min.

Após estas etapas, foi iniciada a revelação do ensaio, na qual foram utilizados 50 µL/poço da solução reveladora, contendo a mistura de 10 mg de OPD, 10 µL de peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂), 6,5 mL de ácido cítrico 0,1 M, 7,0 mL de fosfato de sódio monobásico 0,2 M e 11,5 mL de H₂O destilada por 10 minutos na ausência de luz. A reação foi interrompida adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 3N (H₂SO₄) por poço. A leitura da microplaca foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (Thermo Plate Reader).

Foram utilizados dois tipos de controles: controle da amostra (apenas amostra e revelação) e controle do ensaio (poços sensibilizados somente com o tampão carbonato/bicarbonato e, submetidos a todas as etapas descritas acima).

4.6.3 Avaliação de resposta-cruzada entre o anticorpo anti-Alb 2S de mamona e albumina 2S de *J. curcas*

Foi feito do mesmo modo como descrito no item 4.6.2, sendo neste caso o anticorpo primário usado foi o soro policlonal anti-albumina 2S de *R. communis* e *J. curcas* produzido em coelho diluído 1:500 em tampão bloqueador.

4.6.4 Ensaio para avaliação da atividade alergênica por desgranulação de mastócito

4.6.4.1 Obtenção de Mastócitos

Para analisar as propriedades alergênicas das albuminas 2S de pinhão-manso foi empregado o ensaio de desgranulação de mastócitos obtidos a partir da lavagem peritoneal de ratos.

4.6.4.2 Lavagem peritoneal

Ratos Wistar, obtidos no biotério da UENF, apresentando peso aproximado de 250 g foram empregados como fonte de mastócitos. Os ratos foram sacrificados por asfixia em CO₂ e a cavidade peritoneal foi lavada com 20 mL de DMEM contendo 12 µ/mL de heparina. O lavado foi retirado da cavidade peritoneal com auxílio de pipeta Pasteur após incisão no peritônio do animal (autorização da Comissão de ética no Uso de Animais – CEUA em anexo).

4.6.4.3 Separação por sedimentação em placa de Petri

O lavado peritoneal do rato (15 mL) foi colocado em placa de Petri por 30 minutos a 37 °C. Após esse tempo, 2/3 do meio de cultura foi retirado cuidadosamente da superfície com auxílio de pipeta Pasteur e descartado. O líquido remanescente (cerca de 4-5 mL) contendo os mastócitos foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL. A suspensão final de células foi dividida em alíquotas de 100 µL (FELIX *et al.*, 2008) na qual foram utilizadas nos ensaios de avaliação da atividade alergênica por desgranulação de mastócitos.

4.6.5 Avaliação da resposta dos mastócitos às cadeias leve e pesada da albumina 2S de *J. curcas*

Inicialmente a albumina 2S foi tratada como descrito no item 4.4.1 para separação das cadeias. A resposta dos mastócitos foi avaliada frente as cadeias leve e pesada de Jat c1 a fim de se avaliar o seu potencial alergênico. A determinação foi realizada por contagem dos mastócitos íntegros e desgranulados. Nos diversos ensaios foi utilizado como fonte de IgE o “pool” de soros de ratos (RA/Thor) imunizados contra albumina 2S de pinhão-manso. O teste foi realizado em

três experimentos diferentes, cada experimento foi feito em duplicata para cada alérgeno bem como para os controles.

Alíquotas de 100 μL dos mastócitos (obtidos através de sedimentação em placa de Petri) foram tratadas da seguinte forma: a) Com 1 μL soro anti-albumina 2S de pinhão-manso e com 10 μL das amostras a serem testadas (diferentes peptídeos sintéticos) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para a detecção do percentual de desgranulação nos testes, o “pool” de IgE obtido foi diluído na proporção de 1:100 na suspensão de células. As amostras foram preparadas para que uma concentração final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seja obtida. A mistura foi então incubada por 1 h a 37 °C.

Assim, 10 μL da suspensão de células, após os diversos tipos de incubação foram misturadas durante 15 min com 10 μL de solução aquosa contendo 0,1% de azul de toluidina, 10% de formaldeído e 1% de ácido acético, pH 2,8, para evidenciar a desgranulação. A contagem diferencial das células íntegras e desgranuladas (coradas) foi realizada em câmara de Neubauer, nos quatro quadrantes, sendo visualizados em microscopia de contraste de interferência diferencial de Normarski (DIC) utilizando o microscópio óptico Zeiss Axioplan.

Mastócitos sem tratamento prévio foram também incubados com o corante nas mesmas condições citadas e foram observados ao microscópio óptico. A contagem destas células íntegras e desgranuladas permitiram uma avaliação do procedimento de obtenção (controle negativo).

O ensaio foi feito em triplicada e os resultados mostrados são a média do número de células desgranuladas em função de cada tratamento. O gráfico é mostrado com desvio padrão calculado com o aplicativo do Microsoft Office Excel 2003.

4.7 Investigação de aminoácidos de Jat c1 envolvidos na interação com a IgE

4.7.1 Desenho dos peptídeos

Os dados da sequência primária da albumina 2S de pinhão-manso viabilizaram o desenho de peptídeos sintéticos, possibilitando a proposta de identificação de epitopos alergênicos. Os critérios adotados para o desenho dos peptídeos foi levado em consideração a presença de aminoácido dicarboxílicos e as suas respectivas localizações.

4.7.2 Determinação da homogeneidade dos peptídeos sintetizados

Este ensaio foi feito como descrito no item 4.3.2.

4.7.3 Síntese de peptídeos modificados

Um segundo método foi adotado para verificar a importância da participação dos aminoácidos dicarboxílicos na resposta alergênica. Peptídeos sintéticos modificados foram desenhados, e o critério aplicado foi a substituição de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico) por leucinas. Os peptídeos sintéticos foram produzidos em sintetizador automático de aminoácido pelo método de fase sólida (PS3, *Protein Technologies*). Foram pesados 60 mg de cada aminoácido correspondente ao peptídeo, o mesmo foi organizado no rotor no sentido C-terminal para N-terminal. No reator foram acrescentados 60 mg de resina que serviu de suporte para a síntese. Após a programação do equipamento, o acoplamento foi iniciado. Posteriormente o peptídeo acoplado a resina foi retirado do reator utilizando sistema de lavagem com diclorometano e filtragem a vácuo. Por 2 h, sob agitação, o peptídeo acoplado à resina foi submetido a um coquetel de clivagem utilizando 95% TFA, 2,5% Anizol e 2,5% água. Em seguida foi filtrado utilizando filtro 0,4 µm. Foi lavado com éter gelado três vezes consecutivas e centrifugado a 3.000 g por 5 min a 4° C, sobrenadante foi descartado. Peptídeo obteve apresentação em pó após o mesmo ter secado em temperatura ambiente dentro da capela.

Os peptídeos P1 (VRDICKKEAERRDLS), P3 (PRQQVPRQCCNQAKEL), P5 (LEKQLEEGEVGS), P6 (VGSEDEARRRRTKNII) e P8 (SEDMLAMPGIEN) foram sintetizados pela Dr^a. Maria Aparecida Juliano, Universidade de São Paulo e gentilmente cedidos ao LQFPP.

Após a síntese química dos peptídeos modificados, estes tiveram sua alergenicidade avaliada em ensaio de desgranulação de mastócito de rato (conforme descrito no 4.6.4)

4.7.4 Avaliação da atividade alergênica para investigação de possíveis epitopos ligantes de IgE de albumina 2S de *J. curcas*

Este ensaio foi feito como descrito no item 4.6.4 ensaio para avaliação da atividade alergênica por desgranulação mastócito.

4.7.5 Modificações em resíduos de ácidos glutâmicos

Os peptídeos sintéticos P1, P3, P4, P5, P6 e P8 foram tratados com o reagente WRK. O reagente WRK se liga aos grupamentos carboxílicos de maneira a torná-los inviáveis a futuras ligações, o esquema da reação é apresentado na figura 6.

Foi pesado 1 mg do peptídeo e este diluído em 500 µl de água destilada, em seguida foi adicionado 500 µl da solução de WRK 75 mM em HCl 0,001 M, esta reação incubada a 100 °C por 5 min sob agitação. Os resultados foram analisados por cromatografia de alta eficiência (HPLC) de fase reversa coluna C18, segundo metodologia descrita por Carrielo-Gama, (2006).

Após a modificação com o reagente WRK os peptídeos tiveram sua alergenicidade avaliada em ensaio de desgranulação de mastócito de rato e este ensaio foi feito como descrito no item 4.6.4.

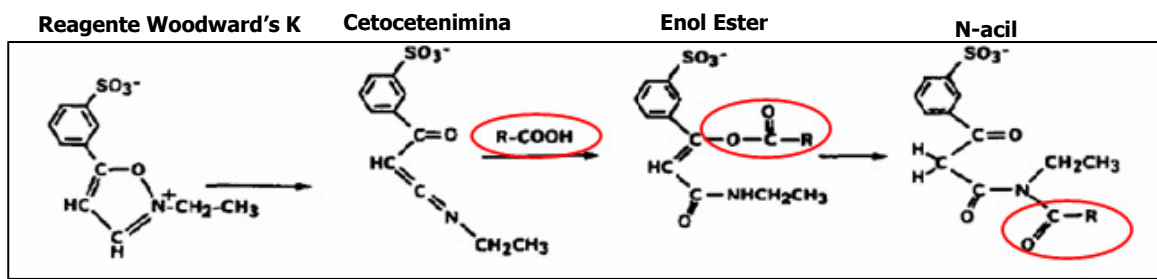


Figura 7: Esquema mostrando a reação do reagente Woodward's K (WRK) ao grupamento carboxílico, no caso de aminoácidos ácidos. O WRK se rearranja formando uma cetocetenimina e ao reagir com um grupamento carboxílico forma um enol ester, no qual se rearranja ao N-acyl.

4.8 Estudos de modelagem por homologia

4.8.1 Alinhamento de estrutura primária e predição de estrutura secundária

Para modelar uma proteína o primeiro passo é encontrar um molde, ou seja, uma proteína com estrutura primária homóloga e estrutura tridimensional desvendada por cristalografia de raios-X ou ressonância nuclear magnética (RMN). Assim, para encontrar um molde para Jat c 1 foi utilizada a ferramenta BlastP, que utiliza um banco de dados de sequências (ALTSCHUL *et al.*, 1997), na qual faz a comparação da sequência da proteína alvo, com outras que apresentem alguma identidade, e a partir desta seleção, pode-se escolher o melhor molde para a modelagem da proteína alvo.

Na busca de um molde para a modelagem da isoforma de albumina 2S de pinhão-mansão, Jat c 1, chegamos a Ric c 3, uma isoforma de albumina 2S de *R. communis*, com estrutura tridimensional determinada por RMN (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2003). A partir das estruturas primárias de Jat c 1 e Ric c 3 foi realizado o

alinhamento de sequência utilizando o programa Clustal-W (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (THOMPSON *et al.*, 1994).

4.8.2 Modelagem por homologia de Jat c1 e processamento de Ric c 3

A estrutura de Jat c 1 foi modelada utilizando como molde a estrutura de Ric c 3, determinada por RMN (PDB = 1PSY). Para a modelagem de Jat c1 foi utilizado o programa Modeller (SALI e BLUNDELL, 1993). Com base na sobreposição de regiões conservadas estruturalmente, identificadas por alinhamento entre Jat c 1 e Ric c 3, o programa gera um conjunto de restrições espaciais e constrói o modelo. A partir do modelo gerado foram realizadas minimizações de energia (aproximadamente 10) para otimizar os parâmetros geométricos do modelo.

A qualidade estereoquímica do modelo foi validada utilizando o programa PROCHECK (disponível em: NIH MBI *Laboratory for Structural Genomics and Proteomics*, <http://nihserver.mbi.ucla.edu>) (LASKOWSKI *et al.*, 1993), que analisa diversos parâmetros incluindo ligações peptídicas, planaridade dos anéis das cadeias laterais e torção dos ângulos ϕ e ψ da cadeia principal.

A estrutura de Ric c 3 determinada por RMN após super-expressão em *Escherichia coli*, apresenta um peptídeo sinal, um peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada e um peptídeo no região C-terminal que não estão presentes na proteína nativa. Para a construção do modelo de Jat c 1 processado estes peptídeos foram retirados da estrutura da proteína, utilizando o programa Swiss-PDB-Viewer (disponível em: <http://www.expasy.org/spdbv>) (GUEx e PEITSCH, 1997), e estrutura processada passou por minimizações energéticas e pela validação.

4.8.3 Modelagem de Jat c1 e peptídeos após substituições de resíduos de ácido glutâmico por leucina

Com base neste estudo, alguns resíduos de ácidos glutâmicos e aspárticos foram substituídos por resíduos de leucina utilizando o programa Swiss-PDB-Viewer. Após a construção da estrutura de Jat c1 alterada, a mesma foi submetida a minimizações de energia, e a avaliação PROCHECK.

5 RESULTADOS

5.1 Purificação de Albumina 2S de sementes de *J.curcas*

Sementes de pinhão foram descascadas e maceradas na qual foi obtido 41,52 g de massa. Processos de retirada de óleo, solubilização e precipitação das proteínas foram empregados. O extrato bruto obtido foi acumulado para os ensaios de cromatografia líquida de exclusão molecular.

5.1.1 Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular:

O extrato protéico das sementes de pinhão-manso foi submetido à filtração em gel Sephadex G-50 resultou no perfil cromatográfico do fracionamento apresentado na figura 1, na qual podemos observar três frações: Fração I (F1) de peso molecular > 40.000 Da, Fração II (F2) fração peso molecular entre 3000 e 40000 Da, na qual deveria estar o “pool de albuminas 2S”; e a Fração III (F3), fração peso molecular < 3000 Da. Estas massas moleculares foram previamente determinadas por Maciel *et al.* (2009). Nosso trabalho concentrou-se na fração de peso molecular intermediário (F2) (Figura 8). Esta foi reunida e posteriormente analisada por cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema de alta eficiência.

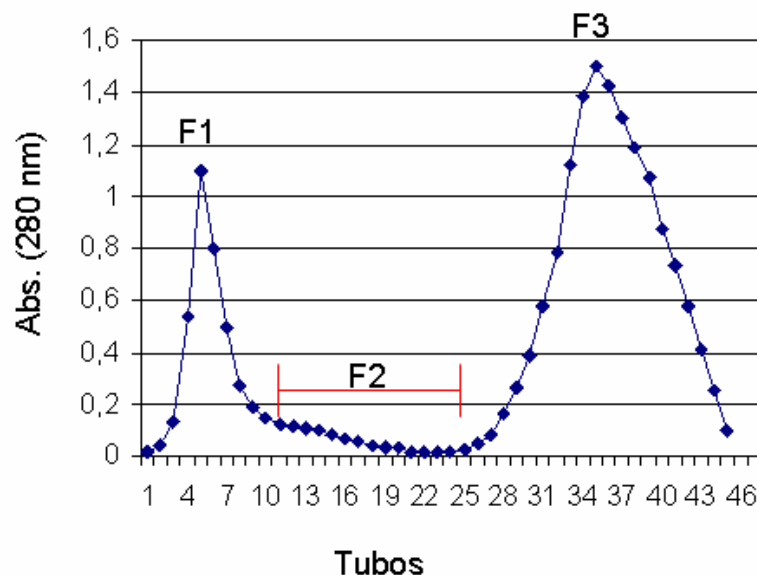


Figura 8: Perfil cromatográfico de exclusão molecular (Sephadex G-50) do extrato bruto de sementes de *J. curcas*. Eluente: Ácido tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Fluxo: 1mL/min. F1: Fração de alto peso molecular; F2: Fração de intermediário peso molecular; F3: Fração de baixo peso molecular.

5.1.2 Fracionamento da F2 por cromatografia de fase reversa (C18- HPLC):

Visando purificar a fração 2 (F2) obtida a partir da cromatografia de exclusão molecular, a mesma foi submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando coluna de fase reversa C18. O perfil cromatográfico característico desta fração encontra-se representado pela linha contínua preta (Figura 9). Foi observado um pico predominante com o tempo de retenção de 28,2 minutos, o seu espectro pode ser observado acima, na qual apresentou um perfil de absorção próximo a 220 nm. Amostra foi acumulada e armazenada para os próximos ensaios de eletroforese em gel de policramida, espectrometria de massa e ensaios de alergenicidade.

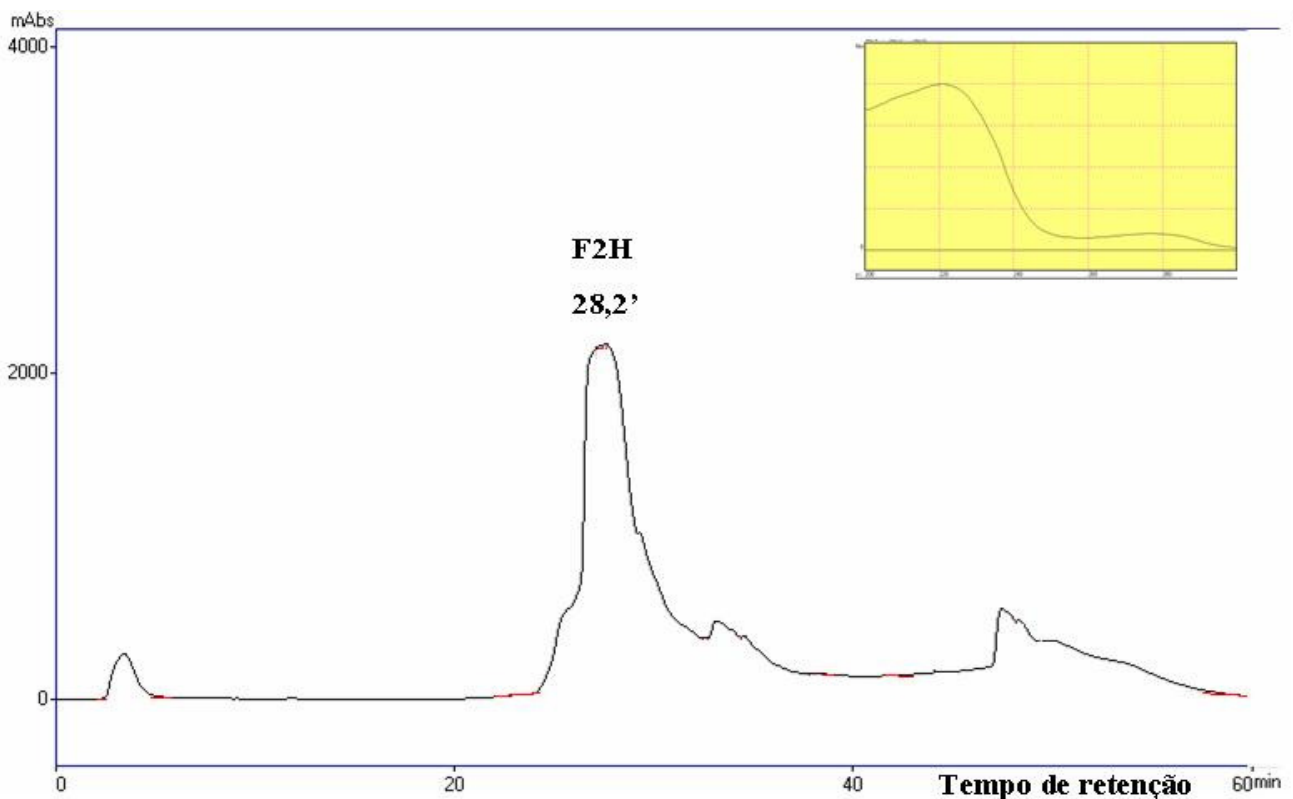


Figura 9: Cromatograma da fração II (F2) obtida da coluna de exclusão molecular (Sephadex G-50) em coluna de fase reversa C18. Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluor-acético (TFA) 0,1% (solução A), e acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O fluxo de eluição empregado foi de 0,7 mL/min. Foi obtido um pico principal chamado F2H.

5.1.3 Eletroforese em gel de policrilamida

As amostras obtidas durante cada etapa do processo de extração e das etapas de purificação foram todas analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % na presença de SDS, segundo o método descrito por Laemmli (1970). Foi observado a presença de uma banda de aproximadamente 14 kDa nas raias correspondentes a albumina 2S de *R. communis* (mamona) (A2S), usada como controle da massa molecular. Na fração 2, correspondente a fração da cromatografia de exclusão molecular (G50) (F2) e na fração de albumina 2S de *J. curcas* (pinhão-manso) após análise por HPLC (F2H) foi verificado a presença de uma banda próxima a 10 kDa, conforme indicado pela seta (Figura 10).

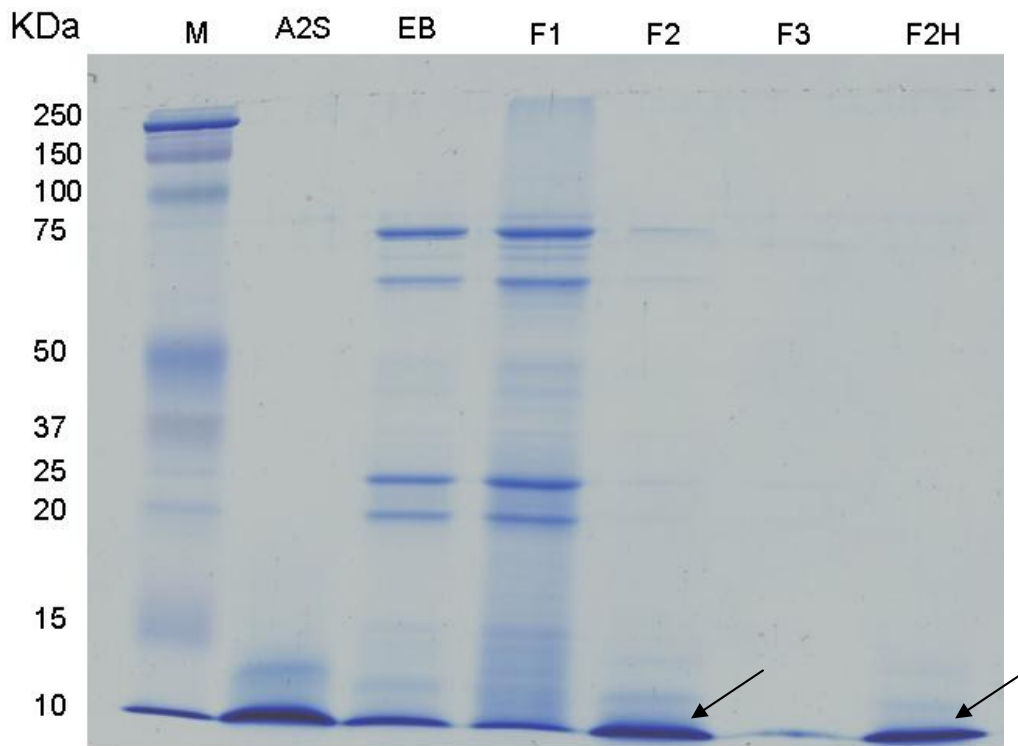


Figura 10: Visualização eletroforética de frações ricas em albuminas 2S obtidas de *J. curcas* em gel de poliacrilamida 15 % na presença de SDS. M: marcador de massa molecular; A2S: Albumina 2S mamona; EB: Extrato Bruto de pinhão-manso; F1, F2 e F3: frações da G50; F2H: Albumina 2S de pinhão-manso após a última etapa do processo de purificação em coluna de fase reversa C18. Gel corado com Coomassie.

5.1.4 Análise da massa molecular por espectrometria

A fim de confirmar o peso molecular da albumina 2S de *J. curcas*, amostra proveniente da etapa de purificação por cromatografia de fase reversa (C18) foi analisada por espectrometria de massas. No espectro (figura 11) foi possível verificar a presença de diversas proteínas, sendo visualizado duas isoformas majoritárias prováveis, na qual apresentaram o peso de 10.254 da e 10.742 Da, respectivamente.

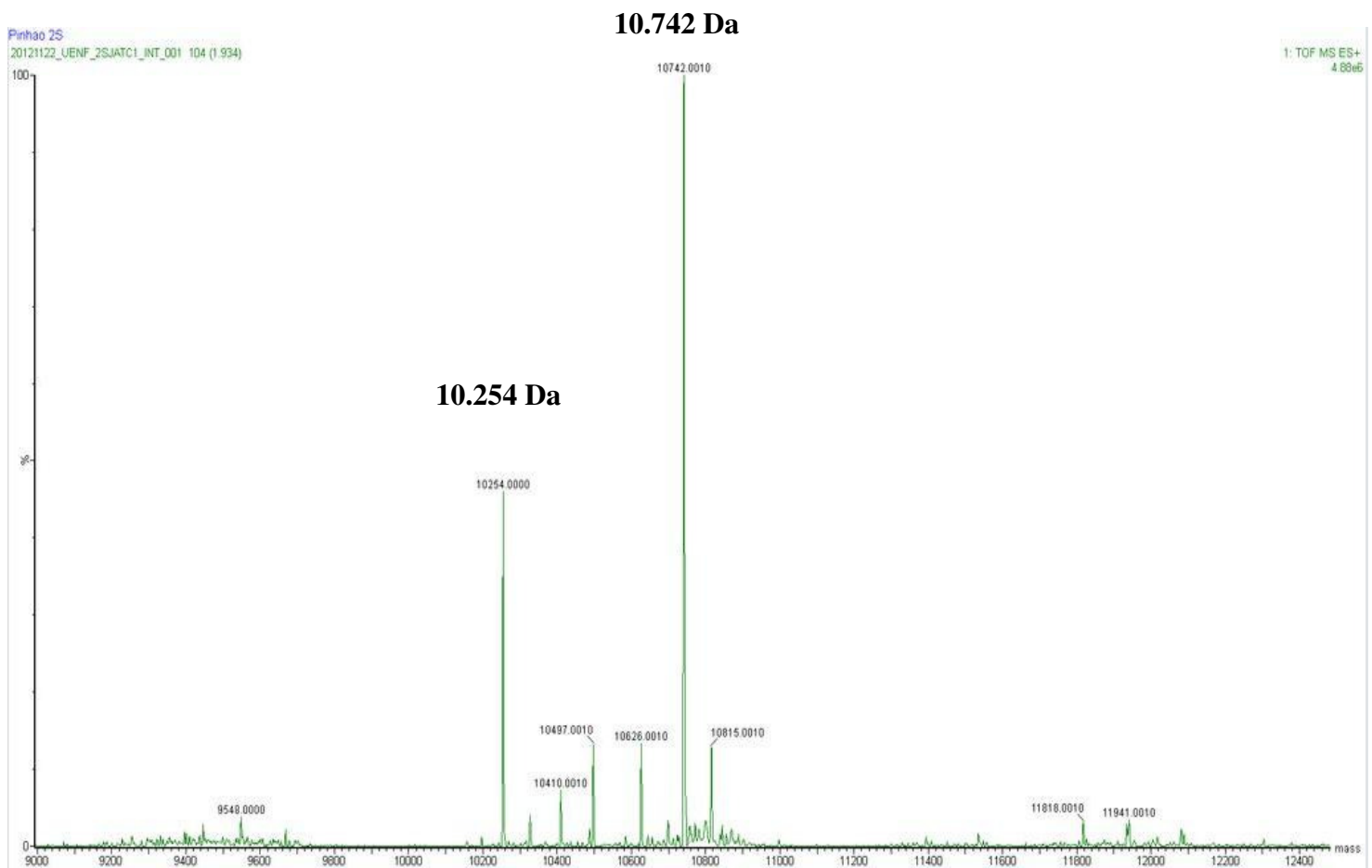


Figura 11: Massa molecular de Jat c1 determinada por espectrômetria de massas. Equipamento: Synapt G2S Waters - Laboratório Experimental da Waters/ São Paulo.

5.2 Caracterização da estrutura primária parcial da albumina 2S de *J. curcas*

5.2.1 Separação das cadeias da albumina 2S de *J. curcas* (Jat c1)

A fim de se investigar a presença de epítopos contínuos, as cadeias de albumina 2S foram separadas após tratamento de desnaturação, redução e alquilação. Foi possível verificar após a cromatografia em coluna de fase reversa C18 as frações denominadas de A e B (figura 12.1). Verificamos nos espectros A e B absorções próximas a 254 nm, região esta na qual são detectadas a vinilpiridina, esta que foi utilizada na etapa de alquilação na separação das cadeias de Jat c 1. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia de fase reversa coluna C2C18 (figura 12.2). A fração A (cadeia leve) apresentou o tempo de retenção de 24,1 minutos e a fração B (cadeia pesada) apresentou o tempo de retenção de 29,3 minutos. As frações foram concentradas e usadas nos ensaios de desgranulação e sequenciamento por Edman.

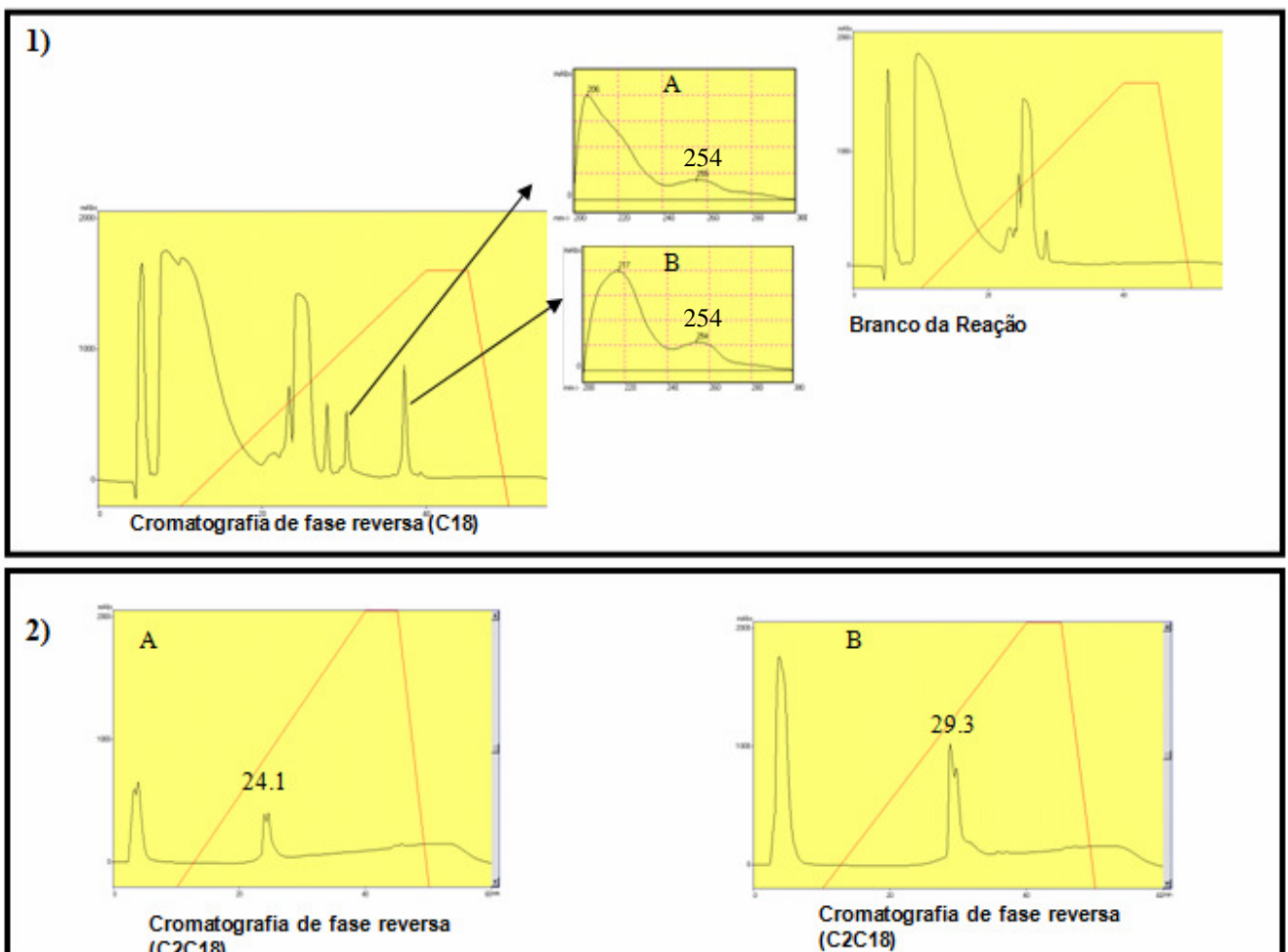


Figura 12.1: Cromatograma da albumina 2S de pinhão-mansô purificada após tratamento de redução e alquilação das pontes dissulfeto após cromatografia de alta eficiência de fase reversa em coluna C18. Em comparação com o branco observa-se a presença de dois picos denominados de A e B,

correspondentes à cadeia leve e cadeia pesada, respectivamente. **Figura 12. 2:** Cromatograma das cadeias leve e pesada, previamente separadas, de albumina 2 S de *J. curcas* em cromatografia de alta eficiência de fase reversa em coluna C2C18.

5.3 Determinação da sequência de aminoácidos da isoforma majoritária de albuminas 2S de *J. curcas* (Jat c1)

A estrutura primária das cadeias leve e pesada de albumina 2S de *J. curcas* obtidas a partir de sequenciamento automático pode ser visualizada no quadro 1. Em vermelho verificamos a cadeia leve esta que apresentou 29 resíduos, e em verde a cadeia pesada que apresentou 32 resíduos. A partir de pesquisa no banco de dados do NCBI foi obtido a estrutura primária de albumina 2S de *J. curcas* contendo 180 resíduos de aminoácidos (Quadro2).

Quadro 1: Sequência parcial amino terminal das cadeias leve, em vermelho, e pesada ,em verde, da albumina 2S de *J. curcas*. Em ambas as cadeias os resíduos de aminoácidos ácidos estão destacados em negrito.

VRDICKKEAERRVLSSCENYITQRRGRSE
PRQQVPRQCCNQAKELSAICRCESIHYLLEKQ

Quadro 2: Estrutura primária de albumina 2S de *J. curcas* a partir de pesquisa no banco de dados do NCBI. A cadeia leve é mostrada em vermelho e a pesada em verde. Em ambas as cadeias os resíduos de aminoácidos ácidos estão destacados em negrito. Em preto está o peptídeo sinal e em cinza está destacado o peptídeo de ligação.

1 DPPGLQVLVIANAVTGYRTIITTV
26 EVDDSSN**VRDICKKEAERRDLSS**
49 **CENYITQRRGRSE** DMLAMPGIEN
72 **PRQQVPRQCCNQAKELSAICRC**
95 **SIHYLLEKQLEEGEVGSEDEARRR**
119 **TKNIIDVCFGSICPRNASCRIKLDL**
145 **VCEELYIMMYKKEHQNKFVRNCFL**
169 **RCFKLSCLVIKT**

5.4 Estudo de epítopos contínuos em albumina 2S de *J. curcas*

5.4.1 Verificação de capacidade ligante de anticorpos específicos contra albumina 2S de *J. curcas*.

Imunoensaios (ELISA) foram utilizados a fim de se avaliar a capacidade ligante de anticorpos específicos, produzidos em camundongo e rato (diluídos 1:500), contra albumina 2S de pinhão-manso isolada. Na figura 13 é possível verificar que o anticorpo produzido em rato, apresentou alta reatividade se comparado ao branco da amostra. O anticorpo produzido em camundongo apresentou menor reatividade se comparado ao anticorpo produzido em rato. Desta forma o anticorpo produzido em rato RA/Thor, com maior reatividade, foi selecionado para ser utilizado nos posteriores ensaios alérgicos.

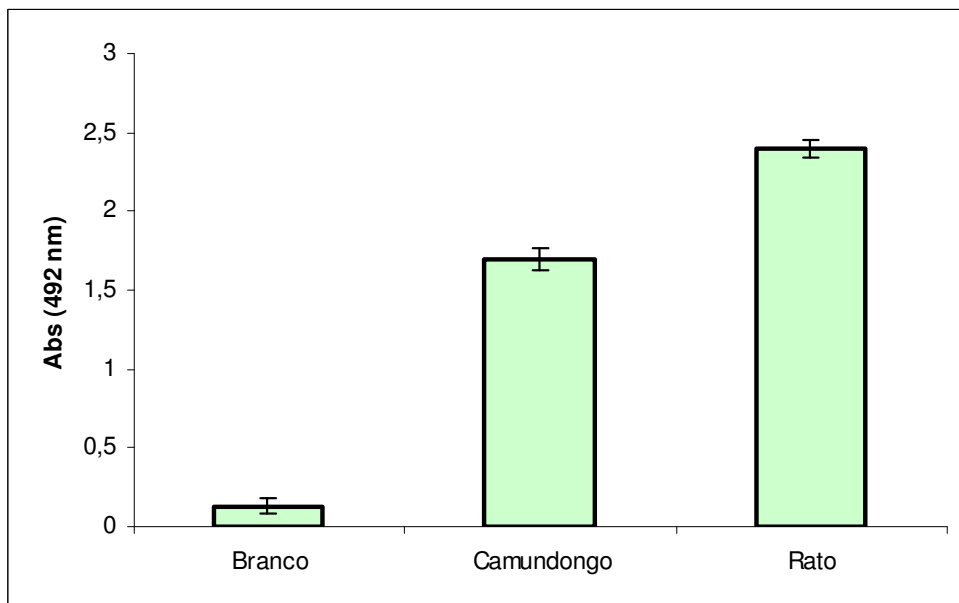


Figura 13: Capacidade de ligação de anticorpos específicos gerados contra albumina 2S de pinhão-manso em camundongos e ratos com albumina 2S purificada de *J. curcas*. . Branco: branco da amostra; Camundongo: anti-pinhão produzido em camundongo; Rato: anti-pinhão produzido em rato.

5.4.2 Avaliação de resposta-cruzada entre o anticorpo anti-Alb 2S de *R. communis* (mamona) e a albumina 2S de *J. curcas*.

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para verificarmos a resposta do anticorpo produzido contra albumina 2S *R. communis* frente a albumina 2S isolada de *J. curcas*. Realizamos a sensibilização da placa com 0,01 µg/uL (100 µL por poço) de albumina 2S purificada em coluna de fase reversa C18 de *J. curcas*. Observamos neste resultado que o anticorpo produzido contra albumina 2S de *R. communis* é capaz de reconhecer a albumina 2S de *J. curcas* (Figura 14).

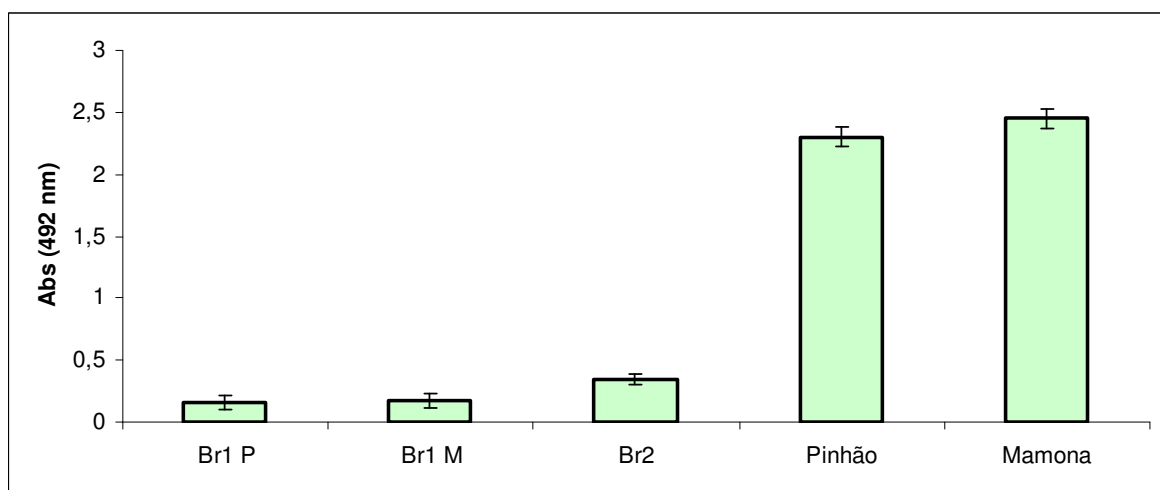


Figura 14: Capacidade de ligação cruzada entre o anticorpo policlonal anti-albumina 2S de *R. communis* produzido em coelho com a albuminas 2S purificada de *J. curcas*. Br1: Branco da amostra; Br2: Branco do tampão; Pinhão: ligação entre albumina 2S isolada de *J. curcas* e anticorpo policlonal anti-albumina 2S de *R. communis*; Mamona: ligação entre albumina 2S isolada de mamona e anticorpo policlonal anti-albumina 2S de *R. communis*.

5.4.3 Ensaio para avaliação da atividade alergênica

A atividade alergênica foi investigada por ensaios de ativação dos mastócitos, onde desgranulação foi desencadeada por albumina 2S e foi avaliada por visualização e contagem das células íntegras e desgranuladas no microscópio ótico (Figura 16). Após contagem do total de mastócitos íntegros e desgranulados, observamos que a fração enriquecida com os mastócitos (controle negativo) apresentou cerca de 20% de desgranulação, no entanto, quando os mastócitos foram sensibilizados com o soro total (fonte IgE) e a albumina 2S foi adicionada, observamos uma desgranulação de aproximadamente 65% das células (Figura 15), representando o controle positivo do ensaio. Substâncias que induziam desgranulação acima de 44% foram consideradas potencialmente alergênicas, conforme a linha pontilhada. Na figura 15 são apresentados os dados referentes ao percentual de desgranulação dos mastócitos na presença de albumina 2S de *J. curcas* (controle positivo) e as suas cadeias leve e pesada. Foi possível observar que as cadeias leve e pesada da albumina 2S de *J. curcas* apresentaram 58,26% e 65,23% de desgranulação, respectivamente, valores próximos ao encontrado no controle positivo. Este resultado indica que os eptitopos de albumina 2S de *J. curcas* são contínuos.

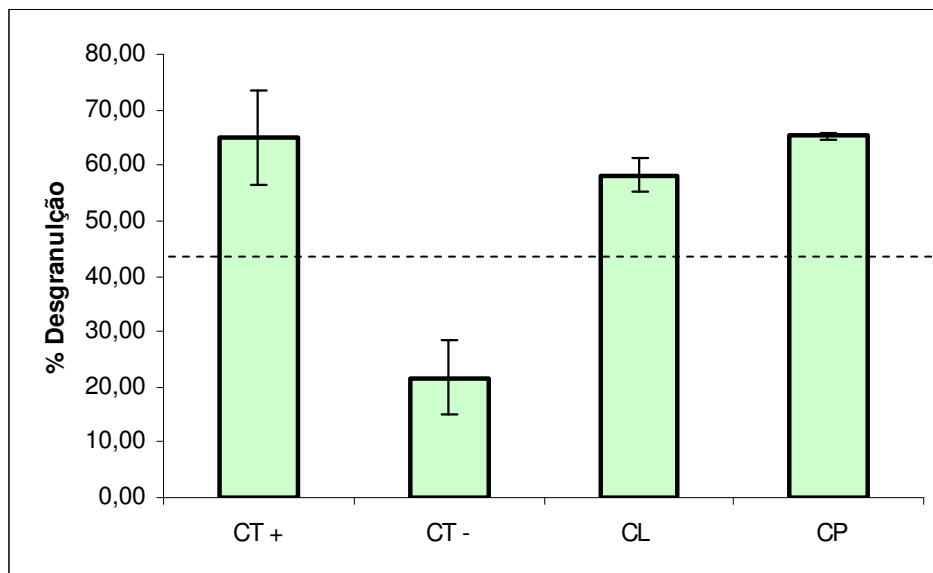


Figura 15: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato tratados com as cadeias leve (CL) e pesada (CP), previamente separadas, da albumina 2S de *J. curcas* e na presença do soro anti-albumina 2S. Controle negativo (CT-): células não-estimuladas; Controle positivo (Ct +): células + albumina 2S de *J. curcas*, Cadeia leve (CL) e pesada (CP) de *J. curcas*.

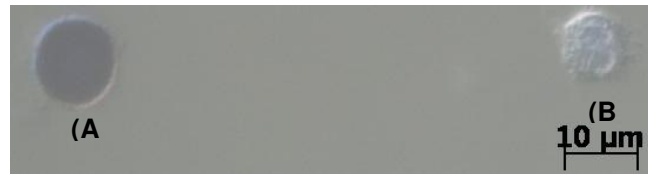


Figura 16: Fotomicrografia de mastócitos do lavado peritoneal de rato corados por azul de toluidina (A) representação de células estimuladas após exposição à albumina 2S na presença de soros como fonte de IgE (células desgranuladas) e (B) representação de células não-estimuladas do lavado peritoneal de rato (células íntegras). Barra = 10 µm.

5.5 Investigação de aminoácidos de Jat c1 envolvidos na interação com a IgE

5.5.1 Desenho de peptídeos sintéticos

A sequência dos peptídeos sintéticos foi obtida a partir da estrutura primária da cadeia leve e pesada de albumina 2S de pinhão-manso. Os peptídeos foram desenhados seguindo o critério da presença e/ou ausência de aminoácidos ácidos (Quadro 3).

Quadro 3: Desenho de peptídeos sintéticos a partir da sequência primária da cadeia leve e cadeia pesada da albumina 2S de *J. curcas*.

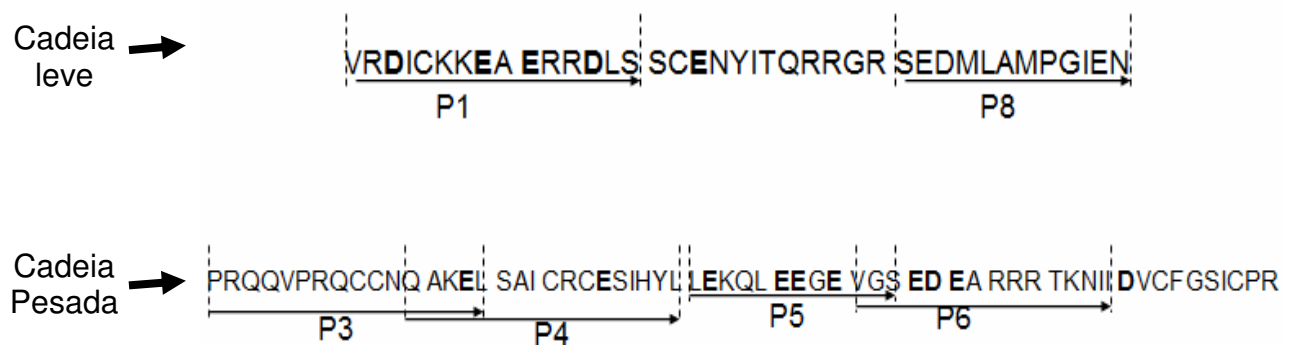


Tabela 1: Peptídeos sintetizados e sua respectiva posição inicial e final na estrutura primária de aminoácidos albumina 2S de *J. curcas*.

Peptídeo	Posição inicial	Posição Final	Sequência
P1	33	47	VRDICKKEAERRDLS
P3	72	87	PRQQVPRQCCNQAKEL
P4	83	99	QAKELSAICRCESIHYL
P5	100	111	LEKQLEEGEVGS
P6	109	123	VGSEDEARRRTKNII
P8	60	71	SEDMLAMPGIEN

5.5.2 Análise da homogeneidade dos peptídeos sintéticos de *J. curcas*

A homogeneidade dos peptídeos foi analisada em cromatografia de alta eficiência de fase reversa coluna C18 (Figura 17) Pode ser observado que os peptídeos apresentaram um pico predominante com o tempo entre 18,09 a 31,91 minutos. Verificamos que os peptídeos P1, P3, P5, P6 e P8 apresentaram homogeneidade, enquanto que o peptídeo P4 apresentou cromatograma mais complexo.

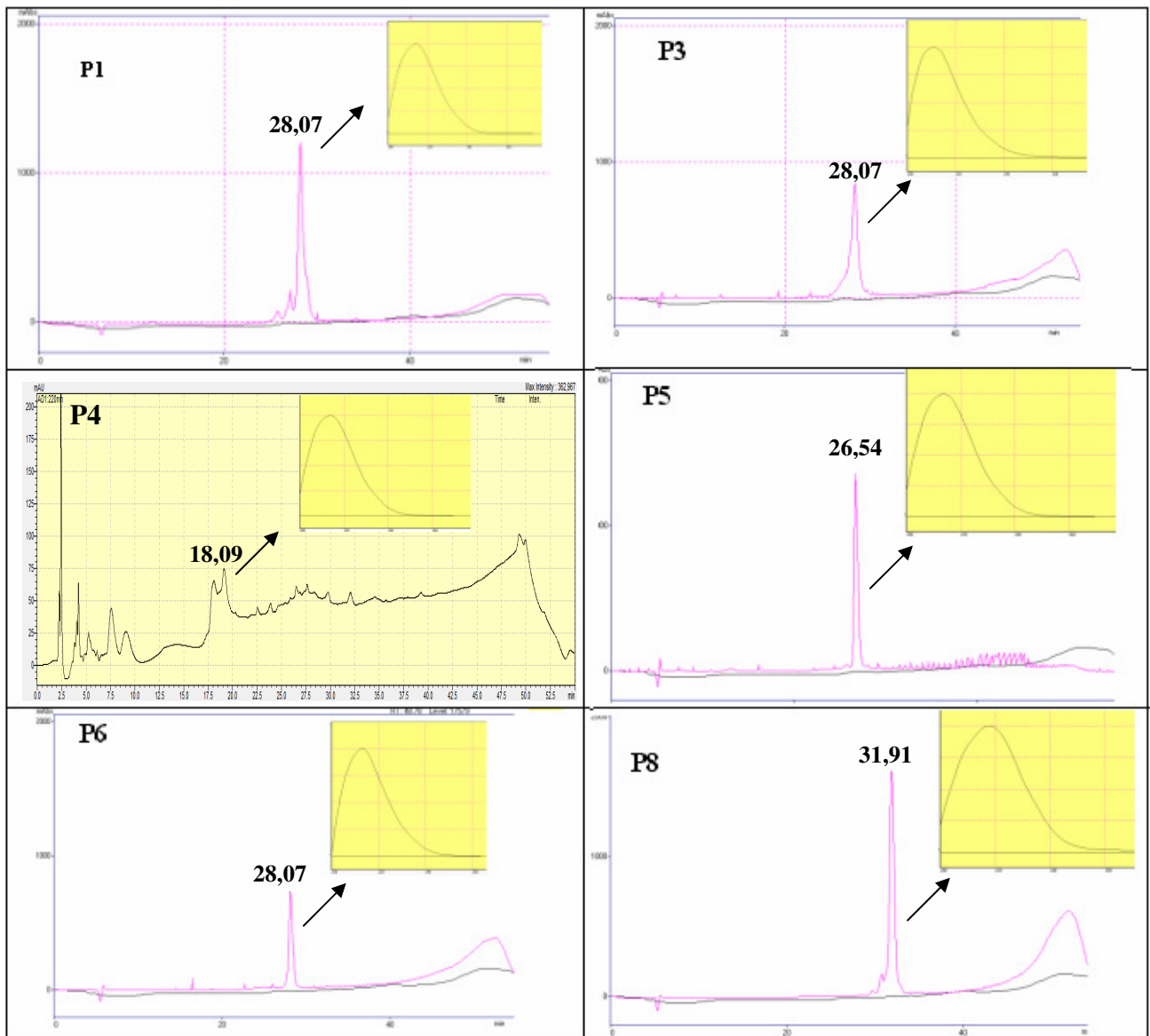


Figura 17: Cromatograma dos peptídeos sintéticos P1, P3, P4, P5, P6 e P8 em cromatografia de alta eficiência coluna de fase reversa (C18). Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluor-acético (TFA) 0,1% (solução A), e acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução 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.

5.6 Avaliação da atividade alergênica para investigação de possíveis epitopos de Jat c1 ligantes de IgE

5.6.1 Ensaio de desgranulação de mastócitos dos peptídeos sintéticos

Com a finalidade de avaliar a atividade biológica dos peptídeos sintéticos frente à alergenicidade, ensaios de desgranulação de mastócitos de rato foram empregados. O percentual de desgranulação pode ser verificado na figura 18. Para este ensaio foram considerados alergênicos aqueles que apresentaram valores acima de 44% de desgranulação, conforme a linha pontilhada. Pode ser observado que todos os peptídeos apresentaram valores de desgranulação próximo ao controle positivo, com exceção do peptídeo P3, este que em sua estrutura possui apenas um aminoácido ácido, apresentou valores próximos ao controle negativo ($\approx 30\%$).

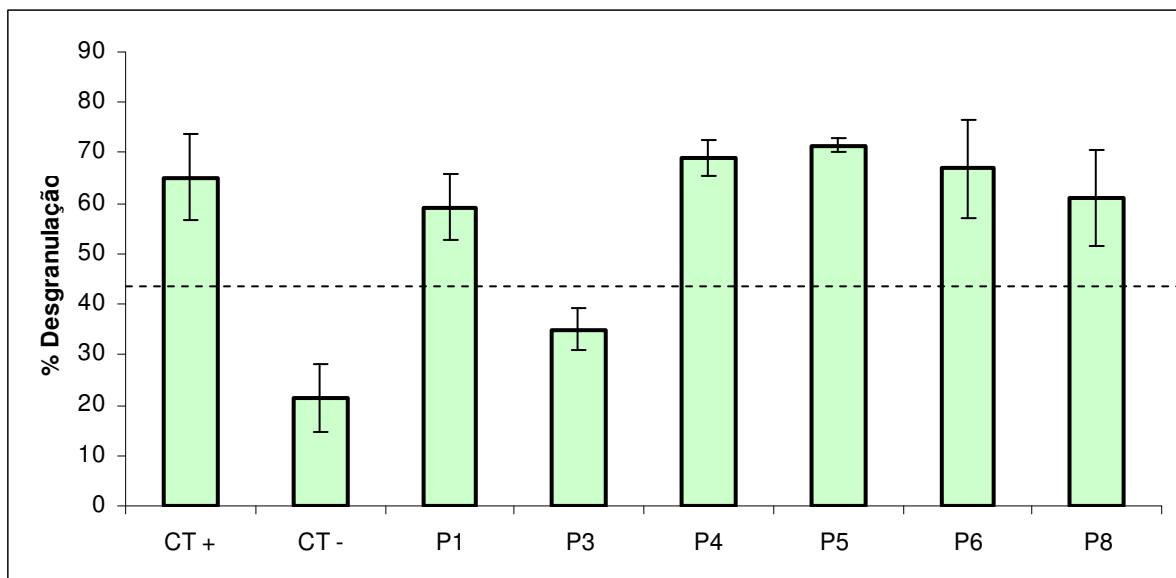


Figura 18: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato tratados com os peptídeos sintéticos e na presença do soro anti-albumina 2S. Controle negativo (CT-): células não-estimuladas; Controle positivo (Ct +): células + albumina 2S de *J. curcas*, e os peptídeos P1, P3, P4, P5, P6, P8.

5.6.2 Avaliação sobre a importância de aminoácidos ácidos na interação com a molécula IgE.

5.6.2.1 Modificações em resíduos ácidos de peptídeos sintéticos

Conforme foi proposto por Felix (2008), o grupamento γ carboxílico do ácido glutâmico e/ou do ácido aspártico poderia estar envolvido na ligação com as IgEs ligadas nos mastócitos. Por este motivo peptídeos sintéticos foram tratados com o reagente WRK, o qual se liga a grupamentos carboxílicos bloqueando o seu sítio de ligação. Após o tratamento os peptídeos foram analisados em cromatografia de fase reversa em coluna C18 é possível observar que alguns peptídeos apresentaram

mais de uma fração (P1w, P3w, P4w1, P4w2, P5w1, P5w2, P6w1, P6w2, P6w3, P8w) (Figura 19).

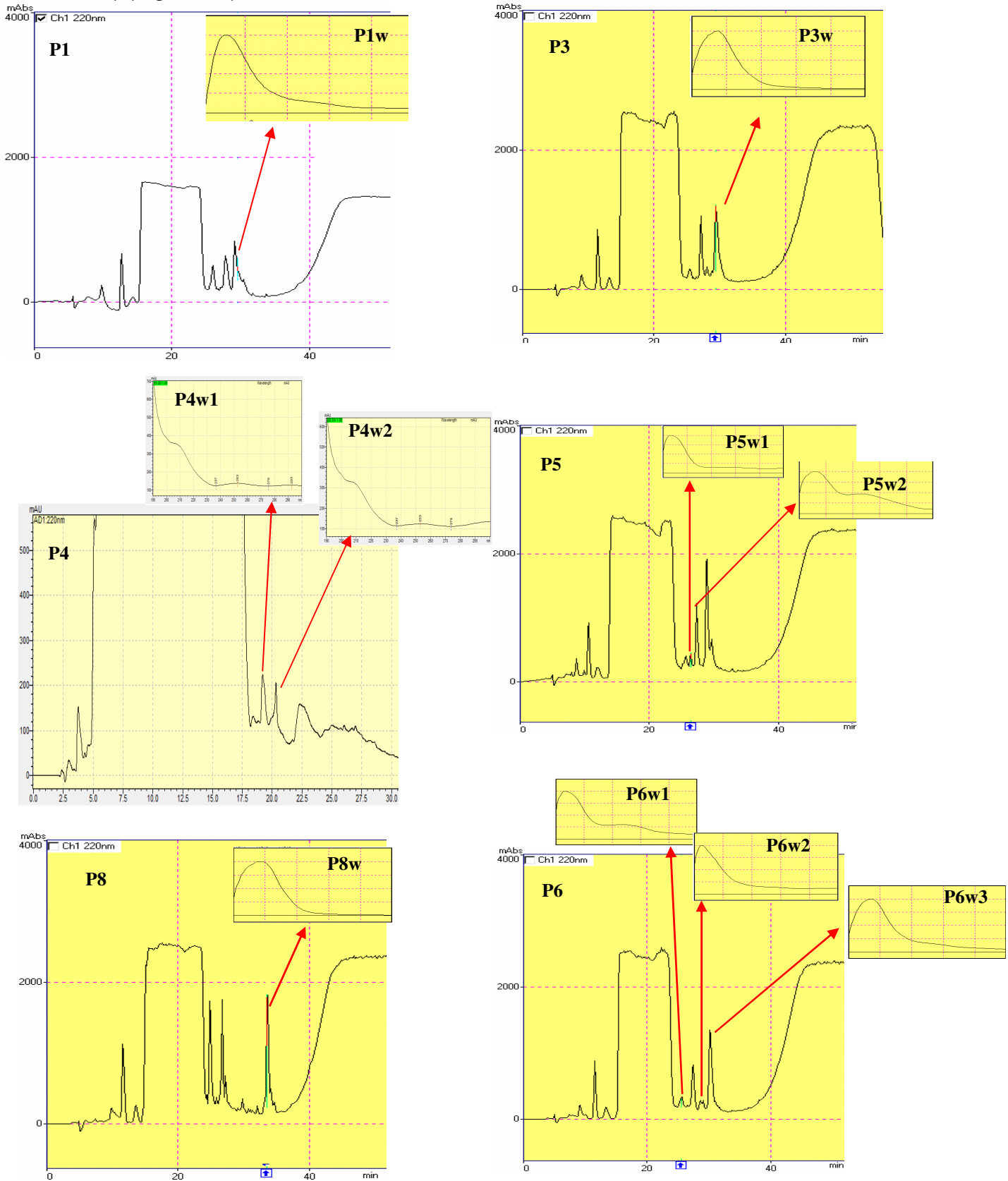


Figura 19: Cromatograma dos peptídeos P1, P3, P5, P6 e P8 tratados com o reagente WRK (N-etil-5-fenilisoxazolium-3'-sulfonato) em coluna C18. Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluor-acético (TFA) 0,1% (solução A), e acetonitrila 80% contendo

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.

5.6.2.1.1 Avaliação da atividade alergênica de peptídeos tratados com reagente bloqueador de grupamentos carboxílicos

Na finalidade de avaliar a importância de aminoácidos ácidos na interação com a IgE, que poderiam ser responsáveis pelo reconhecimento de epitopos alergênicos, ensaios de desgranulação de mastócitos de rato foi empregado. Avaliamos o possível percentual de desgranulação promovido pelos peptídeos tratados e não tratados com WRK quando incubados com os mastócitos obtidos do lavado peritoneal de rato. A figura 20 apresenta os resultados obtidos após estas incubações. Para este ensaio foram considerados alergênicos aqueles que apresentaram valores acima de 44% de desgranulação, conforme a linha pontilhada.

O peptídeo P1 após tratamento químico (P1w) apresentou o percentual de 29,76% de desgranulação, valor próximo ao controle negativo, nota-se uma significativa redução na desgranulação se comparado ao não tratado com valores equivalentes a 60%. O peptídeo P3 após tratamento também obteve redução no percentual de desgranulação, valor reduzido em torno de 10%, porém vale ser ressaltado que este peptídeo apresenta apenas um ácido glutâmico em sua estrutura, e o mesmo quando não tratado já apresentou valores próximos ao controle negativo. O peptídeo P4 ao ser tratado quimicamente apresentou duas frações P4w1 e P4w2 ambas as frações apresentaram uma redução aproximada de 26% no percentual de desgranulação. O peptídeo P5, apresenta quatro ácidos glutâmicos em sua estrutura, apresentou alta atividade alergênica 71,46%, quando tratado com WRK apresentou duas frações, P5w1 e P5w2, e ambas apresentaram os valores de desgranulação de 19,72% e 23,72% respectivamente, dados muito próximos ao controle negativo. O peptídeo P6 apresentou 66,84% de desgranulação e quando tratado quimicamente três frações foram identificadas P6w1, P6w2, P6w3. A fração P6w1 apresentou 22,05% de desgranulação já as frações P6w2 e P6w3 apresentaram o percentual de desgranulação de 41,28% e 44,38% respectivamente. Foi observado que não houve uma redução da alergenicidade de modo significativo nas frações de P6w2 e P6w3. Este fato deve estar associado ao tratamento não efetivo de WRK nestas frações. Já o peptídeo P8 quando tratado com WRK apresentou uma redução expressiva no seu percentual de desgranulação.

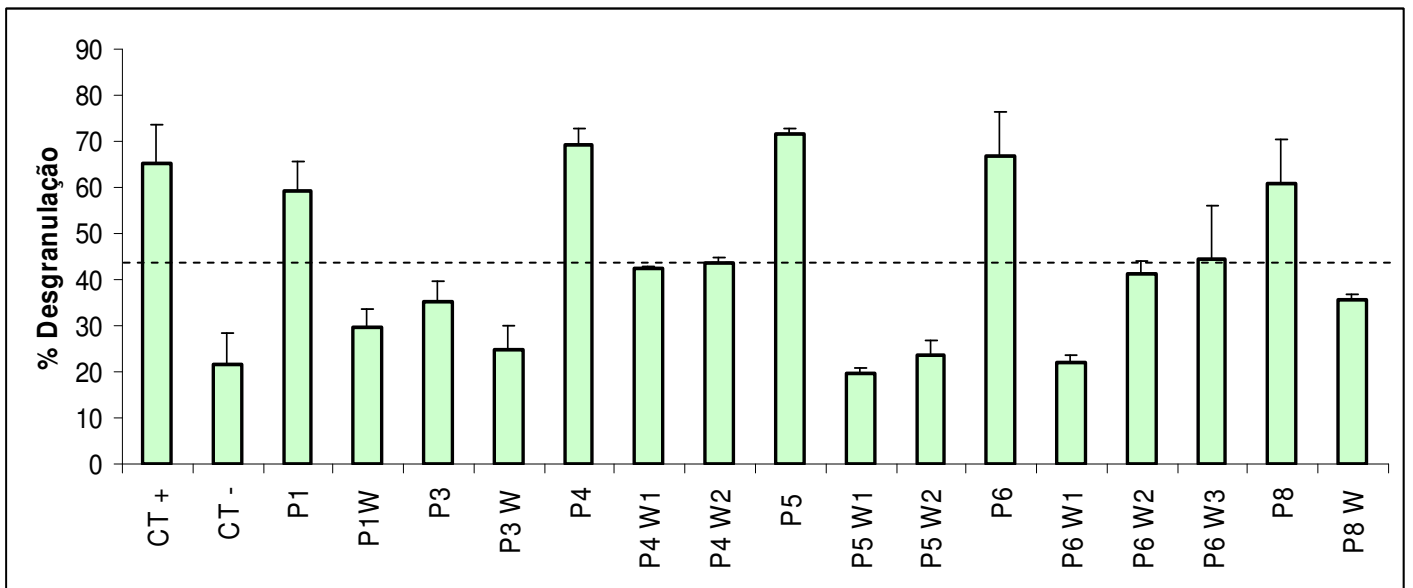


Figura 20: Percentual de desgranulação de mastócitos frente aos peptídeos sintéticos tratados e não tratados com WRK (Woodward's Reagent K). Controle negativo (CT-): células não-estimuladas; Controle positivo (Ct +): células + albumina 2S de *J. curcas*, peptídeos não tratados: P1, P3, P4, P5, P6, P8 e peptídeos tratados com WRK: P1W, P3W, P4W1, P4W2, P5W1, P5W2, P6W1, P6W2, P6W3, P8W.

5.6.2.2 Síntese de peptídeos modificados (Glu X Leu)

Visando a confirmação do envolvimento de resíduos ácidos na ligação IgE-epitopo, foram sintetizados peptídeos modificados onde resíduos estratégicos de ácido glutâmico foram substituídos por resíduos de leucinas (Quadro 5).

Quadro 5: Comparação entre as sequências de peptídeos versus peptídeos modificados, sinalizado em **negrito** os aminoácidos e em **vermelho** as substituições realizadas.

VR D ICK K EAERRDLS P1 ↓	QAKELSAICRCESIH L P4 ↓	LEKQ L EEGEVGS P5 ↓	VGSE D EARRRRTKNII P6 ↓	SE D MLAMP G IEN P8 ↓
VR L ICK K L ALRR D LS P1 LEU	QAK L LSAICRCESIH L P4 LEU	L LKQ L EE G LVGS P5 LEU	VGS L D LARRRRTKNII P6 LEU	S L LMLAMP G IEN P8 LEU

5.6.2.2.1 Avaliação da atividade alergênica de peptídeos modificados

Na figura 21 são apresentados os dados de desgranulação de mastócitos frente aos peptídeos sintéticos e peptídeos modificados. Para este ensaio foram considerados alergênicos os peptídeos que apresentaram valores acima de 44% de desgranulação, conforme a linha pontilhada no gráfico. O peptídeo P1Leu apresentou 43,95% de desgranulação, comparado ao P1 não modificado que apresentou aproximadamente 60% de desgranulação de mastócitos. O peptídeo P4Leu apresentou uma redução de 30,14% nos valores de desgranulação se comparado ao peptídeo não modificado. O peptídeo P5Leu demonstrou ser o menos alergênico, apresentou 25% de desgranulação, se comparado ao não modificado P5, que apresentou 71,46%, podemos dizer que houve uma redução de aproximadamente 46% nos valores de desgranulação. O peptídeo P6Leu também apresentou dados significantes na redução de desgranulação com valores próximos a 35%. O P8Leu apresentou dados reduzidos de alergenicidade estando próximo ao controle negativo. Estes resultados indicam que os resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico são importantes para o desencadeamento do processo alergênico.

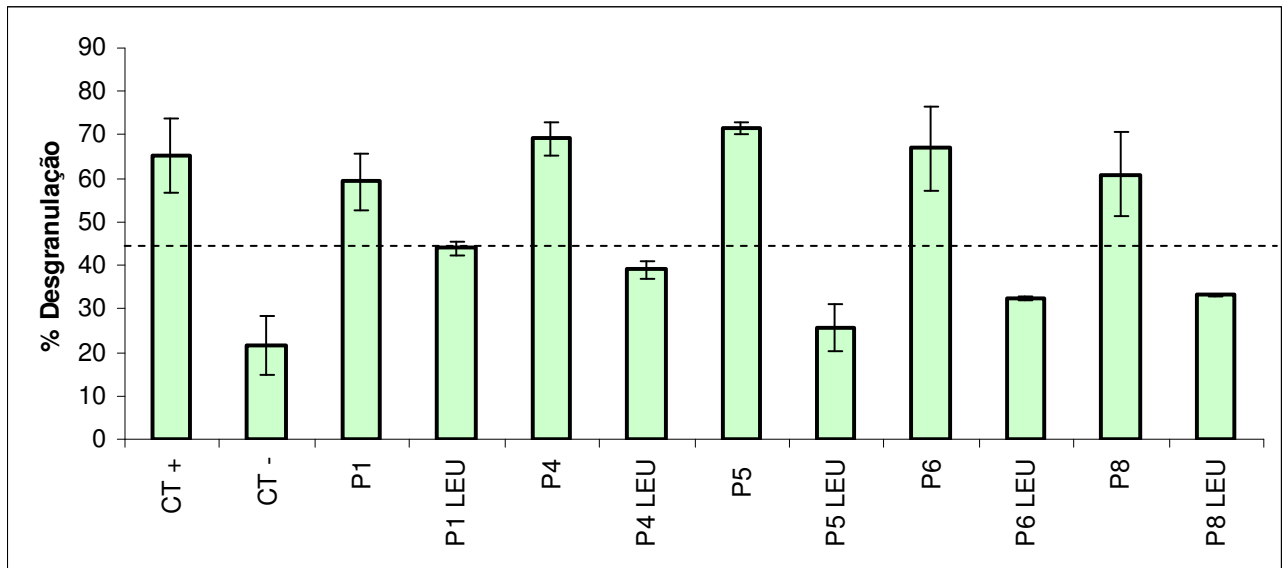


Figura 21: Desgranulação de mastócitos do lavado peritoneal de rato incubados com peptídeos sintéticos que tiveram ácidos glutâmicos substituídos por leucinas e seus respectivos controles. . Controle negativo (CT-): células não-estimuladas; Controle positivo (Ct +): células + albumina 2S de *J. curcas*, peptídeos sintéticos: P1, P4, P5, P6, P8 e peptídeos modificados: P1 leu, P4 leu, P5 leu, P6 leu, P8 leu.

5.7 Modelagem Molecular

5.7.1 Alinhamento de estrutura primária e predição de estrutura tridimensional

O modelo de estrutura tridimensional da albumina 2S de *J. curcas* e peptídeos sintéticos foi obtido após estudos de modelagem molecular utilizando o programa Modeller. A ferramenta BlastP foi utilizada para encontrar um molde para albumina 2S de *J. curcas*. O molde utilizado foi a estrutura de Ric c 3, determinada por RMN. A qualidade estereoquímica dos modelos foi validada utilizando o programa PROCHECK.

Na figura 22 (A) é possível visualizar o modelo de estrutura tridimensional para albumina 2S de *J. curcas*, assim como a identificação das suas pontes de sulfeto. Pode ser observado que o modelo tridimensional de Jat c1 é composto por quatro α -hélices, e quatro pontes de dissulfeto. As cadeias leve (em azul) e pesada (em vermelho) foram identificadas e destacadas na estrutura, também foi caracterizado a posição N-terminal e C-terminal de cada cadeia (figura 22 B). A ilustração da sobreposição da estrutura de Ric c 3 de *R. communis* (em vermelho) e Jat c1 (em azul) esta caracterizada na figura 22(C), na qual pode ser verificado um ótima sobreposição. Na figura 22 (D) pode ser visualizado o Plot de Ramachandran (ϕ e ψ) que valida o modelo de estrutura de albumina 2S de *J. curcas*.

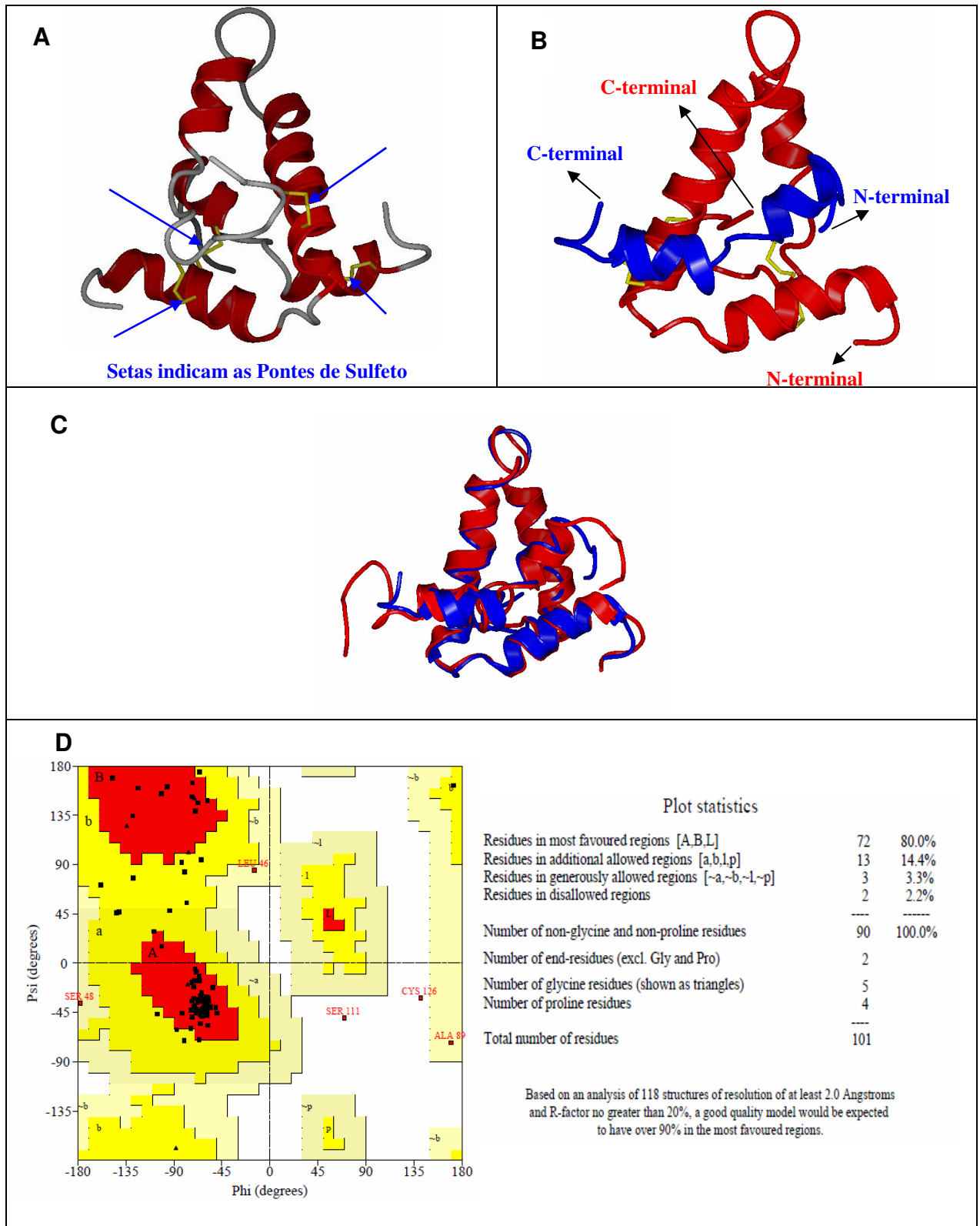


Figura 22: Representação esquemática tridimensional da albumina 2S de *J. curcas*. (A) Modelo de estrutura tridimensional de Jat c1 e a identificação das suas pontes de sulfeto; (B) Representação esquemática de Jat c1 e a identificação da cadeia leve (em azul) e pesada (vem vermelho) a posição N-terminal e C-terminal são indicas pelas setas; (C) Representação esquemática tridimensional da sobreposição da estrutura de Jat c1 (em azul) e Ric c 3 (Vermelho); (D) Plot de Ramachandran (ϕ e ψ) que valida o modelo de estrutura de albumina 2S de *J. curcas*. O grau de regiões de preferência no plot são representados por diferentes cores. Em vermelho, a região mais favorável, as regiões permitidas estão em amarelo, em amarelo claro as regiões geralmente permitidas e em branco as regiões não permitidas. Resíduos de glicina são representados por triângulos. Este plot foi gerado pelo programa PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

5.7.2 Modelagem de Jat c1 e peptídeos após substituições de resíduos de ácido glutâmico por leucina

Na figura 23 (A) é possível visualizar na estrutura tridimensional de Jat c1 e os resíduos de ácidos glutâmicos marcados em azul e os resíduos de ácido aspártico marcados em verde. Na figura 23 (B) é visto o modelo de estrutura de Jat c1 após substituições de aminoácidos ácidos por leucinas. Resíduos de ácido glutâmico e aspártico marcados em azul e verde respectivamente e as leucinas marcadas em preto, modelo elaborado a partir de ferramentas do programa Swiss-PDB-Viewer. Pode ser observado que a estrutura de Jat c1 após modificação é mantida conforme a estrutura não modificada, modelo foi validado conforme o plot de Ramachandran (figura 23C).

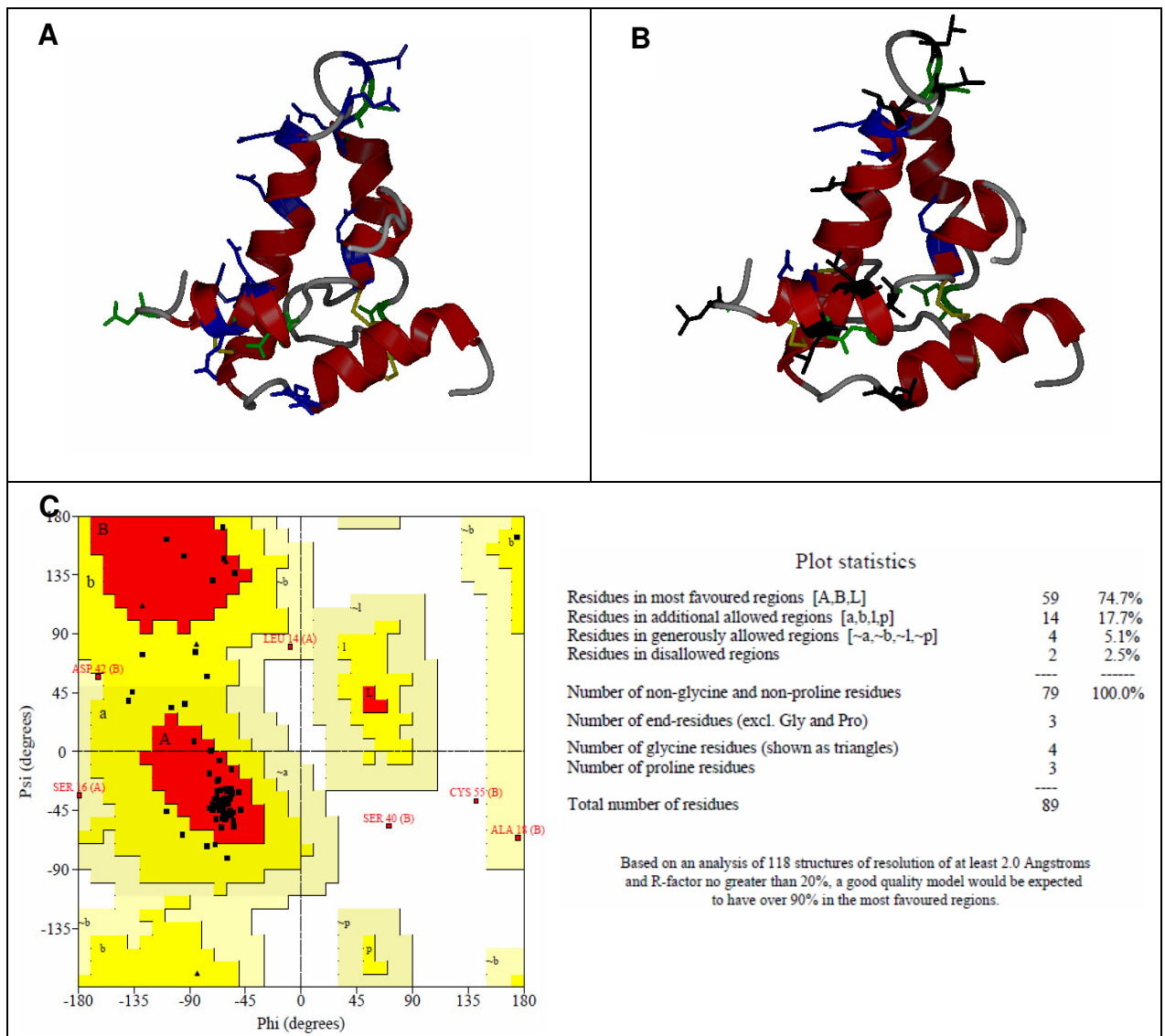


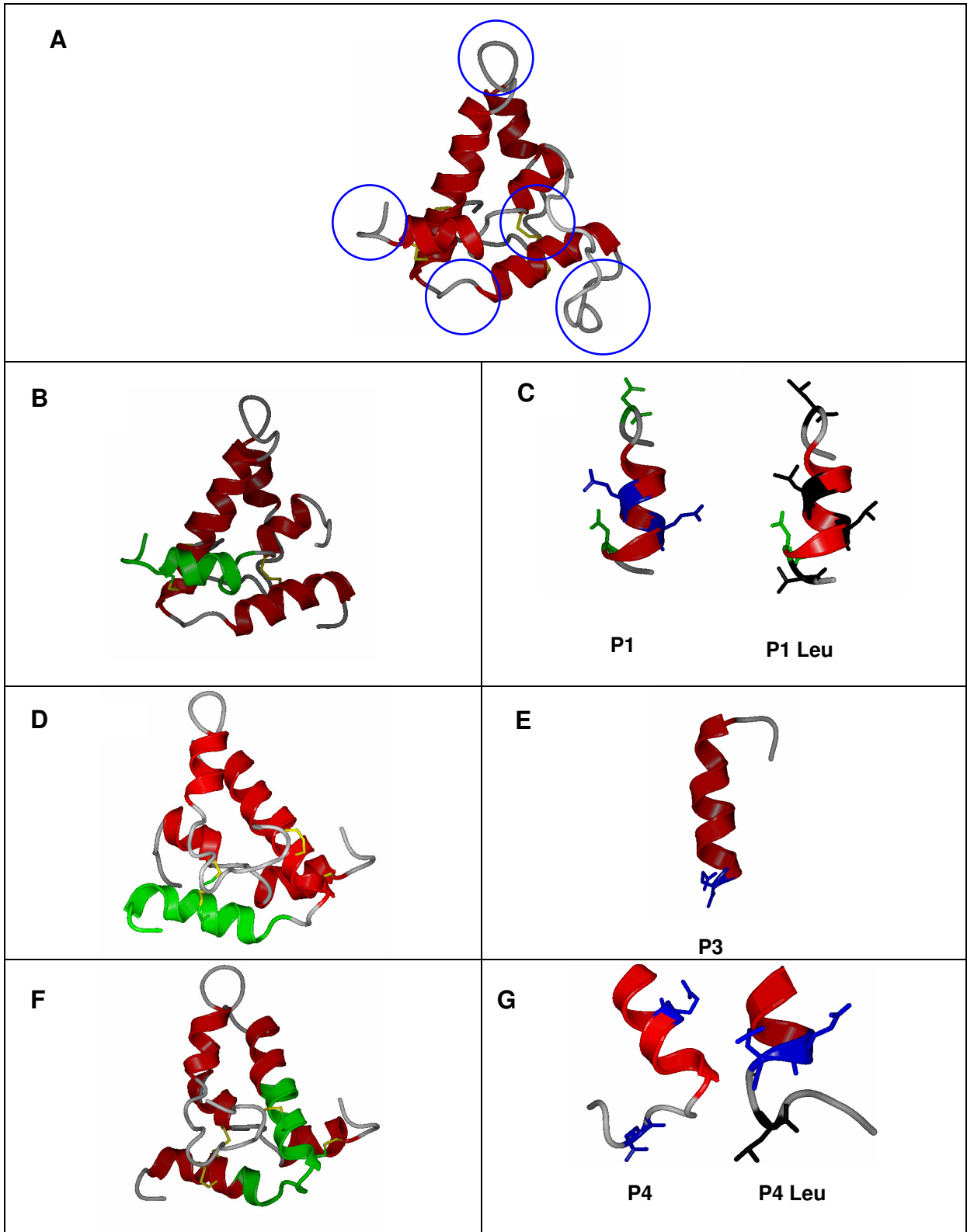
Figura 23: Identificação de aminoácidos na estrutura tridimensional de Jat c1. (A) Estrutura de Jat c1 e a identificação de resíduos de ácidos glutâmicos (em azul) e ácido aspártico (verde). (B) Estrutura de Jat c1 modificada e a identificação de resíduos de ácidos glutâmicos (em azul), ácido aspártico (verde) e leucinas (em preto); (C) Plot de Ramachandran (ϕ e ψ) que valida o modelo de estrutura de albumina 2S de *J. curcas* modificada (em B). O grau de regiões de preferência no plot são representados por diferentes cores. Em vermelho, a região mais favorável, as regiões permitidas

estão em amarelo, em amarelo claro as regiões geralmente permitidas e em branco as regiões não permitidas.

Na finalidade de se avaliar a região de maior interação com a molécula de IgE foi realizado o modelo tridimensional dos peptídeos sintéticos, modificados e a sua respectiva localização na estrutura de Jat c1 (figura 24). Na figura 24 (A) estão identificados por círculos as regiões consideradas mais expostas na estrutura de Jat c1, composta por loop e estruturas não organizadas.

O peptídeo P1 (figura 24 B e C) está localizado entre umas das α -hélices de Jat c1 e parte de sua estrutura se encontra em uma região mais exposta, visto que nesta região há a presença de um ácido aspártico, este que foi substituído por uma leucina (figura 24 C). O peptídeo P3 também se encontra na região da α -hélice e o único ácido glutâmico de sua estrutura não se encontra na região mais exposta. Para este peptídeo não foi realizado a substituição por leucina visto que o mesmo apresenta apenas um aminoácido ácido (figura 24 D e E).

O peptídeo P4 está localizado na região da α -hélice e na estrutura não organizada (figura 24 F). Na estrutura não organizada é observado a presença um aminoácido ácido e o outro se localiza na α -hélice, o aminoácido ácido localizado na estrutura não organizada foi substituído por uma leucina (figura 24 G). Já o peptídeo P5 está localizado entre um loop (região altamente exposta) e a α -hélice, os aminoácidos ácidos estão localizados nas duas regiões tornando o peptídeo um expressivo candidato ao principal epitopo de Jat c1 avaliado neste trabalho (figura 24 H e I). As mesmas observações podem ser verificadas para o peptídeo P6, na qual está localizado entre um loop e α -hélice (figura 24 J). Os aminoácidos ácidos estão localizados na região mais exposta (loop), no peptídeo P6Leu estes aminoácidos foram substituídos por leucinas (figura 24 K). O peptídeo P8 está localizado na estrutura não organizada (figura 24 L) na qual é caracterizada como peptídeo de ligação, esta estrutura geralmente não é encontrada na proteína nativa, apenas resíduos desta, porém o peptídeo de ligação é importante na manutenção da estrutura tridimensional da proteína. A sinalização dos aminoácidos ácidos e a estrutura modificada de P8 está esquematizada na figura 24 M.



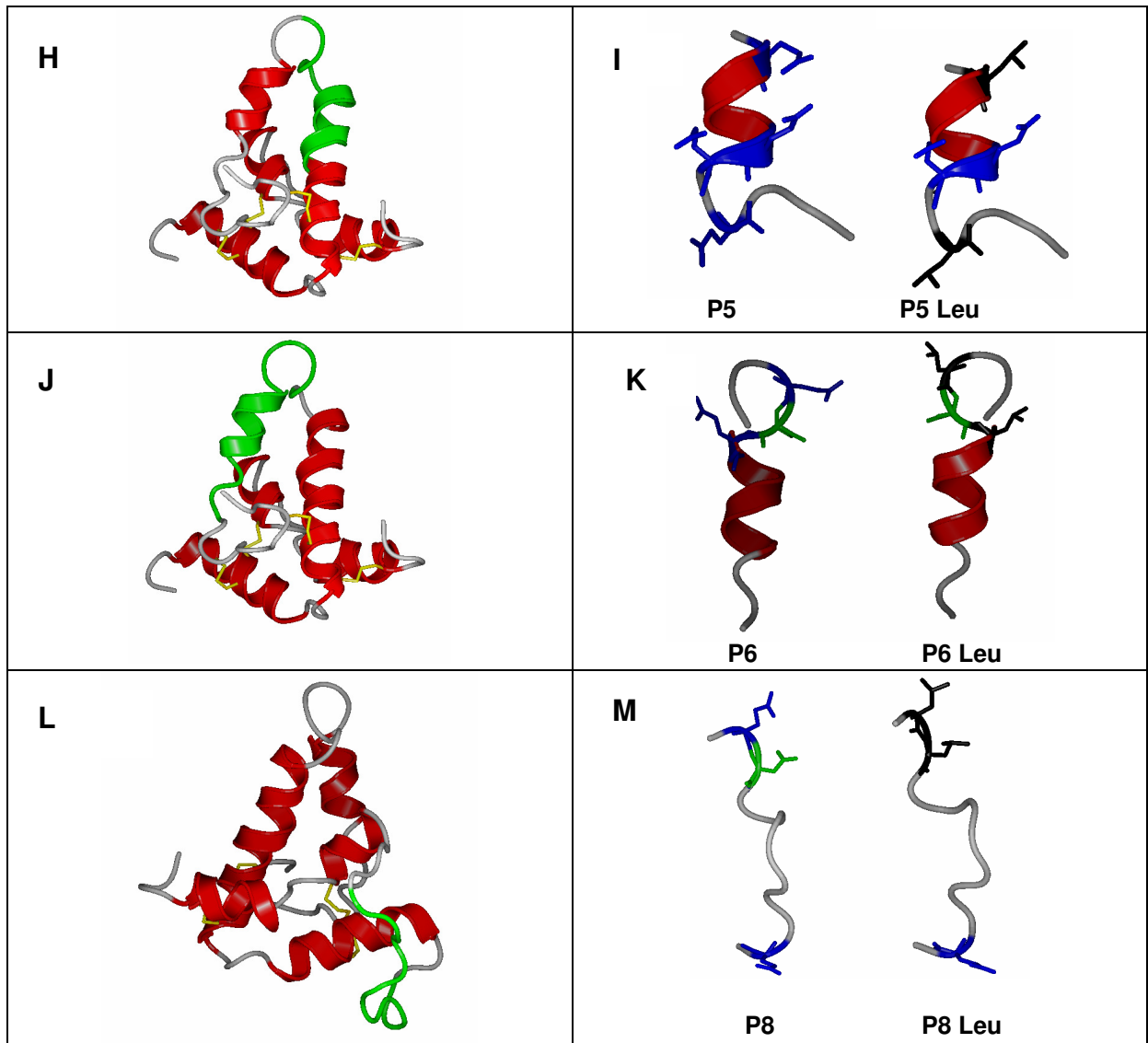


Figura 24: Representação esquemática tridimensional dos peptídeos e sua identificação na estrutura de Jat c1. (A) Identificação das regiões mais expostas na estrutura de Jat c1, consideradas regiões mais prováveis de interação com a molécula de IgE. (B) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P1 identificado na estrutura de Jat c1; (C) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P1 em comparação ao peptídeo modificado P1Leu; (D) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P3 identificado na estrutura de Jat c1; (E) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P3; (F) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P4 destacado na estrutura de Jat c1; (G) Representação esquemática tridimensional e o peptídeo P4 em comparação ao peptídeo modificado P4Leu; (H) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P5 destacado na estrutura de Jat c1; (I) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P5 e P5Leu, (J) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P6 identificado na estrutura de Jat c1; (K) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P6 e P6Leu; (L) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P8 localizado na estrutura de Jat c1; (M) Representação esquemática tridimensional do peptídeo P8 e P8Leu. Os resíduos de ácidos glutâmicos estão identificados em azul, os ácidos aspárticos em verde e leucinas em preto.

6 DISCUSSÃO

A prevalência de alergia alimentar mediada por IgE é de 5% a 8% entre os recém nascidos e entre as crianças com idade inferior a cinco anos. Abrange uma gama de complicações de saúde, como anafilaxia, alergia nasobronquial, síndrome de alergia oral, indução de síndrome de enterocolite, proctocolite, gastroenteropatias eosinofílicas e dermatite atópica (KUMAR *et al.*, 2012). Está estabelecido que a resposta alérgica, e subsequente inflamação, são induzidas pelo reconhecimento de um alérgeno que realiza ligação cruzada com pelo menos dois anticorpos IgE, ligados ao receptor FcεRI de alta afinidade, em células como mastócitos e basófilos (BUFE, 2000).

O local determinante antigênico específico numa molécula é considerado como sinônimo de epítipo (JERNE, 1960). Várias vacinas específicas para o tratamento da alergia alimentar têm sido sugeridas com base nos dados de mapeamento de epítipos ligantes da molécula de IgE. No diagnóstico de alergias, a ligação de IgE a peptídeos tem sido sugerida como uma previsão de biomarcadores, clinicamente relevantes para a severidade ou a persistência de doenças (ALBRECHT *et al.*, 2009).

Para entender a fisiopatologia da alergia, é importante estudar a interação entre alérgeno e o sistema imunológico a nível molecular. Uma abordagem para estudar a relação entre a estrutura da proteína e alergenicidade é identificar epítipos alérgicos, e ao longo dos anos, os epítipos de várias proteínas alérgicas têm sido estudadas (REESE *et al.*, 2001). A proposta deste trabalho foi baseada na caracterização estrutural e mapeamento de epítipos ligantes de IgE de albumina 2S de *Jatropha curcas* L. Primeiramente realizamos a extração e purificação da proteína Jat c1 das sementes de *J. curcas*, através de cromatografia de exclusão molecular (Figura 7) e cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C18 na qual o pico retido em 28,2 minutos foi coletado (Figura 9).

Pela análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% foi possível verificar a marcação das raias da fração 2 da sephadex G50 (F2) e albumina 2S de pinhão após análise por HPLC (F2H) com valores próximos a 10 kDa (Figura 10). Esta massa molecular foi confirmada após análise por espectrometria de massas na qual foi possível verificar a presença de duas isoformas majoritárias na qual apresentaram o peso de 10.254 Da e 10.742 Da (figura 11). Valores similares ao

peso molecular de albumina 2S de pinhão-manso foram encontrados por Maciel *et al.* (2009) e por Nair (2012).

Tem sido argumentado que a maioria dos alérgenos alimentares apresentam epitopos contínuos, porém exceções são descritas (BANNON, 2004). Epitopos contínuos são geralmente conhecidos por serem resistentes ao calor, a desnaturação química e por sofrerem proteólise limitada. Eles tendem a manter a sua reatividade alérgica, enquanto muitos epitopos conformacionais de proteínas nativas são modificados ou interrompido por calor, tratamento químico, ou de ambos, perdendo assim seu potencial de ligação a IgE (BUFE, 2000; IVANCIUC *et al.*, 2009).

A sequência de aminoácido da cadeia leve e pesada foi determinada por sequenciamento automático pelo método descrito por Edman (1950). Da sequência da cadeia leve foram obtidos 29 resíduos de aminoácidos. Para a cadeia pesada foram identificados 32 resíduos a partir da região N-terminal (Quadro 1). A partir das sequências da cadeia leve e pesada, foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e a estrutura primária de Jat c1 foi localizada apresentando um total de 180 resíduos (Quadro 2).

Na finalidade de analisar a ligação de anticorpos IgE contra putativos epitopos de Jat c1, peptídeos P1, P3, P4, P5, P6 e P8 foram sintetizados baseados na sequência de sua cadeia leve e pesada (Quadro 3 e Tabela 1). Estudos relatam que o mapeamento de epitopos utilizando peptídeos sintéticos tem sido empregado com sucesso para diagnosticar tipos de agentes etiológicos, incluindo o vírus da imunodeficiência humana; para o diagnóstico de alergia alimentar, assim como para o desenvolvimento de vacina hipoalérgica (HUANG *et al.*, 1996; ALBRECHT *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2011).

Está estabelecido que no desenvolvimento da resposta alérgica ocorre uma ligação cruzada de dois anticorpos IgE (ligados a receptores FcεRI nos mastócitos e/ou basófilos) com pelo menos dois epitopos do alérgeno (ABBAS, 2003). O trabalho desenvolvido por Deus-de-Oliveira *et al.* (2011) descreve a importância de aminoácidos ácidos, em epitopos de albuminas 2S de *R. communis* (mamona), Ric c 1 e Ric c 3, na interação com a molécula de IgE. Baseado nestes dados e na resposta cruzada entre *J. curcas* e *R. communis*, peptídeos de Jat c1 foram desenhados utilizando o critério de ausência e/ ou presença de pelo menos dois resíduos de aminoácidos ácidos dicarboxílicos. A homogeneidade dos peptídeos foi

analisada por cromatografia de alta eficiência de fase reversa em coluna C18 (Figura 17).

Na avaliação da importância de aminoácidos ácidos na interação com a molécula de IgE, modificações na cadeia lateral dos aminoácidos ácidos dos peptídeos P1, P3, P4, P5, P6 e P8 foram realizadas utilizando reagente WRK, o qual se liga a grupamentos dicarboxílicos. Esta estratégia foi adotada para o possível bloqueio do sítio de ligação dos peptídeos com a IgE reduzindo a alergenicidade desencadeada por estes. Amostras tratadas foram analisadas por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Figura 19). Nos cromatogramas é possível observar a presença de mais de uma fração para os peptídeos P4, P5 e P6, as mesmas foram coletadas para a análise de alergenicidade.

Segundo metodologia desenvolvida por Mayerhoffer (2004), baseada em estudos de desgranulação de mastócitos de rato, na qual viabilizou a identificação de epitopos alergênicos, este método foi empregado para avaliar a atividade alergênica dos peptídeos sintéticos e as suas variações conforme tratamento químico ou modificações em sua sequência de aminoácidos.

O resultado da avaliação da alergenicidade foi obtido por microscopia óptica através de contagem diferencial entre mastócitos íntegros e desgranulados. Na figura 16 é mostrada a morfologia de mastócitos, obtidos por lavagem peritoneal de ratos Wistar e o padrão adotado na identificação de mastócito íntegro e desgranulado. Desta forma, observamos as cadeias leve e pesada de albumina 2S de *J. curcas* quando incubadas com os mastócitos de rato. Dentre o controle positivo foi encontrado, em média 65% de desgranulação e para o controle negativo o valor médio de 21%. As cadeias leve e pesada da albumina 2S de *J. curcas* foram avaliadas e os valores respectivos foram encontrados 58,26% e 65,23% (Figura 15). Estes dados confirmam que os epitopos da albumina 2S de *J. curcas* são contínuos, já que as suas cadeias passaram pelo tratamento de desnaturação, redução e alquilação (figura 12) e mesmo assim mantiveram sua atividade alergênica, apresentando valores próximos ao controle positivo. Estudos relatam que processos alérgicos desencadeados por epitopos contínuos são mais persistentes e intensos se comparado a aqueles desenvolvidos por epitopos conformacionais, sendo de suma importância a identificação e caracterização destes (BEYER, 2003; SICHERER e SAMPSON, 2003).

Vários estudos têm tido como foco os alérgenos que contêm epitopos conformacionais. Hantusch (2004) localizou dois epitopos conformacionais de Phl p 5a, alérgeno do pólen de gramíneas, utilizando mimotopos a partir de imunoenaios combinados à modelagem molecular. Robotam *et al.* (2009) identificaram o primeiro epitopo conformacional 2B5, da globulina 11S da *Anacardium occidentale* L. (castanha de cajú), Ana o 2, utilizando ensaios com anticorpo monoclonal murino, resultados podem embasar estudos que visem o desenvolvimento de reagentes específicos para identificação de alérgenos, assim como no desenvolvimento de vacinas.

Embora os epitopos conformacionais às vezes sejam considerados de maior importância em condições alérgicas em comparação com os epitopos contínuos, existem situações em que o reverso parece ser verdadeiro (ROBOTHAM *et al.*, 2009). Caracterizando esta afirmativa, Untersmayr e Jarolim (2006) descrevem que as primeiras respostas ao principal alérgeno do leite, caseína, ocorrem pelo reconhecimento de epitopos conformacionais, porém mais tarde as respostas são desencadeadas a partir de epitopos contínuos. Crianças que superam alergias ao principal alérgeno do ovo e a caseína podem desenvolver IgE para epitopos conformacionais, porém permanecem alérgicas na idade adulta quando ocorre a ligação de IgE com epitopos contínuos deste alérgenos (ROBOTHAM *et al.*, 2009).

Embora tenha sido relatado que a caracterização de epitopos conformacionais seja difícil, os epitopos contínuos podem ser caracterizados a partir de sobreposição de pequenos peptídeos sintéticos. Testes de alergenicidade podem ser aplicados a partir de ensaios utilizando soros de pacientes com alergia alimentar documentada (WOFF *et al.*, 2004). Isto tem sido demonstrado no caso dos alérgenos do amendoim, Ara h e Ara h 2, e alérgenos do leite de vaca b-lactoglobulina (BALL *et al.*, 1994; SHIN *et al.*, 1998)

Reese *et al.* (2001), a partir da construção de uma biblioteca de peptídeos recombinantes e por sobreposição de peptídeos sintéticos, localizou quatro putativos epitopos, a partir de peptídeos recombinantes no centro N-terminal de Pen a 1, principal alérgeno do camarão e nove peptídeos sintéticos no C-terminal da mesma molécula.

Neste trabalho almejamos caracterizar putativos epitopos ligantes de IgE de albumina 2S, principal alérgeno de *J. curcas*. Avaliamos a resposta alérgica através do desafio de peptídeos sintéticos frente aos ensaios de desgranulação

(Figura 18). Peptídeos quando encubados com os mastócito de rato e fonte de IgE apresentaram os seguintes valores de desgranulação: P1 (59,21%); P3 (35,08%); P4 (69,08%); P5 (71,46%); P6 (66,84%) e P8 (60,95%). Analisando a sequência de aminoácidos dos peptídeos todos apresentaram pelo menos dois aminoácidos ácidos disponíveis para interação com a molécula de IgE, com exceção do peptídeo P3. O peptídeo P3 possui apenas um resíduo de aminoácido ácido em sua sequência e o mesmo apresentou 35,08% de desgranulação, valor próximo ao controle negativo. Este dado reforça a hipótese da importância dos aminoácidos ácidos na interação com a molécula de IgE, relação também constada por Deus-de-Oliveira (2011) e Felix (2008). Peptídeos tratados com o reagente WRK foram avaliados quanto a sua capacidade alergênica. Na figura 20 é possível verificar o percentual de desgranulação de mastócitos frente aos peptídeos tratados e não tratados com WRK. Os peptídeos P1, P5 e P8 apresentaram maior redução de desgranulação após o tratamento químico, demonstrando uma redução acima de 30%. Analisado a sequência de aminoácidos destes peptídeos (Tabela 1) pode ser verificado que estes apresentam três ou mais resíduos de aminoácidos ácidos. O peptídeo P5 após tratamento apresentou duas frações, P5w1 e P5w2, e estas demonstraram reduções expressivas no percentual de desgranulação, reduzindo aproximadamente 50% a atividade alergênica.

Na finalidade de reafirmar a importância de aminoácidos ácidos na interação com a molécula de IgE nova estratégia foi adotada. Peptídeos foram sintetizados a partir de substituições de aminoácidos ácidos por leucinas, P1Leu, P4Leu, P5Leu, P6Leu e P8Leu. A comparação da sequência de aminoácidos de peptídeos sintéticos e modificados podem ser vistos no quadro 5. A atividade alergênica foi verificada a partir de ensaios de desgranulação de mastócitos (Figura 21). Os peptídeos P5Leu, P6Leu e P8Leu foram aqueles que apresentaram menor potencial alergênico. P6Leu e P8Leu passaram por duas modificações na qual dois aminoácidos ácidos foram substituídos por leucinas, apenas um aminoácido ácido foi mantido em suas sequências. Estes dados devem ser associados à relevância de aminoácidos ácidos na interação com a molécula de IgE. O peptídeo P5Leu passou por duas modificações, dois resíduos de ácidos glutâmicos foram substituídos por leucinas. Dois aminoácidos ácidos, lado a lado, foram mantidos na sua sequência. A distância ideal entre dois anticorpos IgE ligado a um alérgeno, até o momento não foi calculada (BUFE, 2000). Porém nos ensaios de alergenicidade foi possível notar

que o P5Leu apresentou baixa atividade alergênica (25,65%), este dado pode estar associado ao fato da existência de uma distância “necessária” entre os aminoácidos para haver interação com as moléculas de IgE. Na figura 24(H,I) podemos visualizar a proximidade dos ácidos glutâmicos na representação da estrutura tridimensional dos peptídeos P5 e P5Leu, revelando uma região não propícia a interação com a molécula de IgE.

Os ensaios de desgranulação de peptídeos modificados indicam que estes possíveis epitopos perderam a capacidade de desgranular mastócitos, apresentando dados próximos ao controle negativo, reforçando a hipótese do envolvimento destes aminoácidos no processo de deflagração da alergia. Garmatiuka *et al.* (2013) Através do uso de bioinformática verificou que aminoácidos carregados negativamente (aminoácidos ácidos) estão envolvidos na interação com a molécula de IgE. Em seu trabalho foi Identificado um duplo mutante do principal alérgeno de *Brassica rapa*, como um candidato promissor para imunoterapia de pacientes alérgicos a alérgenos de pólen ligantes de cálcio.

O modelo tridimensional previsto para Jat c1 mostra uma estrutura com quatro α -hélices na qual é estabilizado por quatro pontes de sulfeto (figura 22 A). A estrutura de Jat c1 apresentou homologia com a proteína Ric c 3 de *R. Communis* e sua ótima sobreposição é mostrada na figura 22 C. Dados próximos ao modelo de estrutura tridimensional de Jat c1 foi mostrado por Nair *et al.* (2012). As modificações na estrutura de jat c1 após substituições de aminoácidos ácidos por leucinas por ser verificada na figura 23 A e B. Foi observado que após a modificação a estrutura tridimensional de jat c1 foi mantida conforme a não modificada.

Foi observado na estrutura de Jat c1 pequenos seguimentos de regiões variáveis, na qual sua estrutura não está organizada (figura 24), regiões estas que foram definidas como local característico de epitopos ligantes de IgE, essenciais ao desencadeamento do processo alérgico (MORENO e CLEMENTE, 2008). Nas regiões variáveis, ou seja, regiões mais expostas foram identificadas parte da estrutura dos peptídeos P1, P4, P5, P6 e P8 (figura 24). Os peptídeos P5 e P6 foram destacados na probabilidade de interação com a molécula de IgE, já que se encontram localizados dentro de um loop na estrutura de Jat c1 (figura 24 H e J). Analisando os dados de alergenicidade, identificamos que tanto o peptídeo P5 e P6 apresentaram altos índices de desgranulação, em destaque o peptídeo P5, este que apresenta quatro ácidos glutâmicos em sua estrutura.

Acreditamos, que apesar de não serem mapeados todos os putativos epitopos de Jat c1, possivelmente resíduos de ácidos glutâmicos, ou ainda resíduos de ácido aspártico, poderiam ser fundamentais para a interação IgE/antígeno.

7 CONCLUSÕES

- Epitopos de albumina 2S de *J. curcas* demonstraram ser resistente à desnaturação, redução e alquilação mantendo sua atividade alergênica, caracterizando estes como epitopos contínuos;
- Jat c1 apresenta resposta cruzada frente a anticorpos produzidos contra albumina 2S de mamona;
- O reagente WRK (Woodward's Reagent K) mostrou ser eficiente em todos os tratamentos com os peptídeos sintéticos, mostrando este reduzida alergenicidade e adicionalmente a importância de aminoácidos ácidos para este processo;
- A estratégia de modificação de aminoácidos ácidos por leucinas exibiu maior eficiência na redução da alergenicidade se comparada ao tratamento químico com Woodward's Reagent K;
- O peptídeo P5 destacou ser o epitopo que induziu maior atividade alergênica, conseqüentemente sendo aquele que apresenta maior número de ácidos glutâmicos em sua sequência de aminoácidos;
- Aminoácidos ácidos de albumina 2S de *J. curcas* são importantes na interação com a molécula de IgE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALBERSE, R.C.; CRAMERI, R. (2011). IgE-binding epitopes: a reappraisal. *Allergy*; 66: 1261-1274.
- AALBERSE, R.C. (2000). Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 106(2):228-238.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. (2003). *Imunologia Celular e Molecular*. 4. ed. Revinter, 544p.
- ABDELGADIR, H.A.; JOHNSON, S.D.; VAN STADEN, J. (2008). Approaches to improve seed production of *Jatropha curcas* L. *South African Association of Botanists* 74:359
- ABD-ELHAMID, H.F. (2004) Investigation of induced biochemical and histopathological parameters of acetonitrile extract of *Jatropha curcas* in albino rats. *Egyptian Society of Parasitology* 34:397-406.
- ACHTEN, W.M.J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y.J.; MATHIJS, E.; SINGH, V.P.; AERTS, R.; MUYS, B. (2008) *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass. Bioenergy* 32:1063-1084.
- ADAM, S. (1974). Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. *Toxicology* 2:67-76.
- ADERIBIGBE, A.O.; JOHNSON, C.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.; FOIDL, N. (1997). Chemical composition and effect of heat on organic matter and nitrogen degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. *Animal Feed Society Technology* 67:223-243.
- ADOLF, W.; OPFERKUCH, H.J.; HECKER, E. (1984). Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. *Phytochemistry* 23: 129-132.
- AGIZZIO, A. P.; CARVALHO, A. O.; RIBEIRO, S. F.; MACHADO, O. L.T. (2003). A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Archives of biochemistry and biophysics* 416:188-195.
- ALLEN, G. Sequencing of proteins and peptides. (1989). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Elsevier*, Bundon R. H. & Knipperg, 2 ed., P. H. editors.
- ALBRECHT, M.; HOLZHAUSER, T.; LIDHOLM, J.; KUHNE, Y.; LAUER, I.; REESE, G.; WEBER, B.; REUTER, A.; VIETHS, S.; BECKER, W.; FALK, S.; RANDOW, S.; BORSTEL, L.; WANGORSCH, A. (2009). Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(2): 328-336.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z., MILLER, W.; LIPMAN, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new

generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17): 3389-33402.

ANAND, P.; SINGH, B.; JAGGI, A.S.; SINGH, N. (2012). Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology* 385: 657-670.

ARNON, R., VAN REGENMORTEL, M.H. (1992). Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB Journal*. 6: 3265-3274.

ASTWOOD, J.D.; LEACH, J.N.; FUCHS, R.L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature biotechnology*. 14: 1269-1273.

BALL, G.; SHELTON, M.J.; WALSH, B.J.; HILL, J.; HOSKING, C.S.; HOWDEN M.E. (1994). A major continuous allergenic epitope of bovine β -lactoglobulin recognized by human IgE binding. *British Society for Allergy and Clinical Immunology* 24: 758-764.

BANNON, G.; FU, T.J.; KIMBER, I.; HINTON, D.M. (2003). Protein digestibility and relevance to allergenicity. *Environ. Health Perspect*, 111: 1122-1124.

BANNON, G.A. (2004). What establishes a protein as an allergen? *Current allergy and asthma reports* 4: 43-46.

BECKER, K.; MAKKAR, H.P.S. (2008). *Jatropha curcas*: a potential source for tomorrow's oil and biodiesel. *Lipid Technol* 20: 104-107.

BEYER, K. (2003). Characterization of allergenic food proteins for improved diagnostic methods. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 3: 189-197.

BISCHOFF, S.C. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature reviews Immunology* 7: 93-104.

BOYCE, J.A. (2003). Mast cells: beyond IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 11: 25-32.

BREITENEDER, H.; RADAUER, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal of allergy and clinical immunology*. 113(5): 821-830.

BREITENEDER, H.; MILLS, C.E.N. (2005). Plant food allergens: structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, 23(6): 395-399.

BUFE, A. (2000). Significance of IgE-binding epitopes in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(2): 219-221.

CARVALHO, B.C.L.; OLIVEIRA E.A.S.; LEITE, V.M.; DOURADO, V.V. (2009). Informações técnicas para o cultivo do pinhão-mansão no Estado da Bahia. Salvador: EBDA, 79p. II.

CARRIELO-GAMA, C. (2006). Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epítopos alergênicos de *Ricinus communis* (mamona). Monografia (Bacharelado em

Biociências e Biotecnologia), Campos dos Goytacazes – RJ - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF.

CHEN, M.J.; HOU, L.L.; ZHANG, G.W. (1988). The diterpenoids from *Jatropha curcas* L. *Acta Botanica Sinica* 30(3): 308-311.

CHIERICE, G.O.; NETO, S.C. (2007). Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P., BELTRÃO, N. E. M. *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA. *Informação Tecnológica*, 504p.

DALL'ANTONIA, F.; GIERAS, A.; DEVANABOYINA, B.S.C. (2011). Prediction of IgE-binding epitopes by means of allergen surface comparison and correlation to cross-reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128: 182-189.

DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; FELIX, S.P.; CARRIELO-GAMA, C.; FERNANDES, K.V.; DAMATTA, R.A.; MACHADO, O.L.T. (2011). Identification of critical amino acids in the IgE epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the application of glutamic acid as an IgE blocker. *PLoS ONE* 6(6): e21455.

DEVAPPA, R.K.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. (2010). Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass and Bioenergy*, 34: 1125-1133.

EL-AGAMY, E.I. (2007). The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68(1-2): 64-72.

EL-BADWI, S.M.A.; ADAM, S.; HAPKE, H.J. (1995). Comparative toxicity of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* in brown hisex chicks. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 102: 75-77.

EDMAN, P.; Högfeldt, E.; Sillén, L. G.; Kinell, P. (1950). "Method for determination of the amino acid sequence in peptides". *Acta Chemical, Scand.* 4: 283-293. doi:10.3891/acta.chem.scand.04-0283.

FAGBENRO-BEYIOKU, A.F.; OYIBO, W.A.; ANUFOROM, B.C. (1998). Disinfectant/antiparasitic activities of *Jatropha curcas*. *Africa Medical Journal*, 75: 508-511.

FELIX, S.P., MAYERHOFFER, R.O., DAMATTA, R.A., VERÍCIMO, M.A., NASCIMENTO, V.V., MACHADO, O.L.T. (2008). Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. *Peptides* 29: 497-504.

FLOISTRUP, H.; SWARTZ, J.; BERGSTROM, A.; ALM, J.S. (2006). Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117: 59-66.

GARMATIUKA, T.; SWOBODAA, I.; KROPFMÜLLERA, A.T.; DALL'ANTONIA, F.; KELLERC, W.; SINGHD, M.B.; BHALLAD, P.L.; OKADAD, T.; TORIYAMAE, K.; WEBERA, M.; GHANNADANF, M.; SPERRF, W.R.; BLATTF, K.; VALENTF, P.; KLEINA, B.; NIEDERBERGERG, V.; CURINA, M.; BALICH, N.; SPITZAUERH, S.; VALENTA R. (2013). Characterization of mutants of a highly cross-reactive calcium-

binding protein from *Brassica* pollen for allergen-specific immunotherapy. *Immunobiology* 218:1155-1165.

GUBITZ, G.M.; MITTELBECH, M.; TRABI, M. (1999). Exploitation of tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology* 67: 73-82.

GIERAS, A.; CEJKA, P.; BLATT, K. (2011). Mapping of conformational IgE epitopes with peptide-specific monoclonal antibodies reveals simultaneous binding of different IgE antibodies to a surface patch on the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Journal of Immunology*, 186: 5333-5344.

GIERAS, A.; FOCKE-TEJKL, M.; BALL, T.; VERDINO, P. (2007). Molecular determinants of allergen-induced effector cell degranulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 19: 384-390.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K.; (2007). Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals. *International journal of toxicology*. 26: 279-288.

GUEx, N.; PEITSCH, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.

HANTUSCH, B.; KRIEGER, S.; UNTERSMAJR, E.; SCHOLL, I.; KNITTELFELDER, R.; FLICKER, S.; SPITZAUER, S.; VALENTA, R.; BOLTZ-NITULESCU, B.; SCHEINER, O.; JENSEN-JAROLIM, E. (2004). Mapping of conformational IgE epitopes on Phl p 5a by using mimotopes from a phage display library. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114(6): 1295-1300.

HELLER, J. Physic nut. *Jatropha curcas* L. promoting the conservations and use of underutilized and neglected crops. (1996). *Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italy. p. 66

HELM, B.; KEBO, D.; VERCELLI, D.; GLOVSKY, M.M.; GOULD, H. (1989). Blocking of passive sensitization of human mast cells and basophil granulocytes with IgE antibodies by recombinant human epsilon-chain fragment of 76 amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 9465-9469.

HEUSSER, C.; JARDIEUT, P. (1997). Therapeutic potential of anti-IgE antibodies. *Atopic allergy and other hypersensitivities*, 9: 805-814.

HILLER K.M.; ESCH, R.E.; KLAPPER, D.G. (1997). Mapping of an allergenically important determinant of grass group I allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100: 335-340.

HUANG, J.; WEY, J.; LEE, H.; TSOU, T.; WU, C.; WU, J.; CHEN, H.; CHIN, C.; CHIEN, L.; CHEN, L.; WU, Y.; PAN, M.; WANG, T. (1996). Identification of immunodominant, group-specific and subcomplex-specific, continuous epitopes in the core regions of Japanese encephalitis virus using synthetic peptides. *Virus Research*, 41: 43-53.

IVANCIUC, O.; SCHEIN, C.H.; GARCIA, T.; OEZGUEN, N.; NEGI, S.S.; BRAUN, W. (2009). Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54: S11-S19.

JERNE, N.K. (1960). Immunological speculations. *Annual review of microbiology*, 14: 341-358.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1999). *Histologia básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 426p.

KAUSHIK, N.; KUMAR, K.; KUMAR, S.; KAUSHIK, N.; ROY, S. (2007). Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. *Biomass Bioenergy*, 31: 497-502.

KARAJ, S., MÜLLER, J. (2010). Determination of physical, mechanical and chemical properties of seeds and kernels of *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products*, 32: 129-138.

KING, A.J.; HE, W.; CUEVAS, J.A.; FREUDENBERGER, M.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I.A. (2009). Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany*, 60(10): 2897-2905.

KIRTIKAR, K.R.; BASU, B.D. (1991). *Indian medicinal plants*. Shiva Publishers, Dehradun, 4: 2240-2247.

KUMAR, A.; SHARMA, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. *Industrial crops and products*. 28: 1-10.

KUMAR, S.; VERMA, A.K.; DAS, M.; DWIVEDI, P.D. (2012). Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *International Immuno pharmacology*, 13: 432-439.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26: 283-291.

LESTARI, D.; WIM, J.M.; JOHAN, P.M.S. (2011). *Jatropha* *Jatropha* seed protein functional properties for technical applications. *Biochemical Engineering Journal*, 53:297–304

LI, C.-Y.; DEVAPPA, R.K.; LIU, J.-X.; LV, J.-M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. (2010). Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 620-625.

LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. (2003). Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(3): 241-246.

LOUZADA, P.; OLIVEIRA, F.R.; SARTI, W. (2003). Anaphylaxis and anaphylactoid reactions. *Medicina*, Ribeirão Preto, 36: 399-403.

MACHADO, O. L. T., Silva Jr., J. G. (1992) – An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is part of the 2S albumin precursor predicted by c-DNA data. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25: 567-582.

MACHADO, O.L.T.; MARCONDES, J.A.S.; SILVA, F.S., RIBEIRO, P.D., VERÍCIMO, M.M.; KANASHIRO, M.; SILVA JR.; J.G., SANTOS, M.F.; COSTAESILVA, M. C. (2003). Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. *Allergologie*, 26(2): 45-51.

MACIEL, F.M.; LABERTY, M.A.; DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; FELIX, S.P.; SOARES, A.M.S.; VERÍCIMO, M.A.; MACHADO, O.L.T. (2009). A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties. *Peptides*, 30(12): 2103-2107.

MAYERHOFFER, R.O. (2004). Identificação de peptídeos alergênicos de albumina 2S de *Ricinus communis* (Mamona). Dissertação de mestrado em Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes – RJ - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF.

MAKKAR, H.; MAES, J.; DE GREYT, BECKER, K. (2009). Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 86: 73-181.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. (2009). *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. *European journal of lipid science and technology*, 111:773-787.

MORENO, F.J.; CLEMENTE, A. (2008) 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? *The open biochemistry journal*, 2:16–28

NITHIYANANTHAM, S.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G. (2012). Potential of *Jatropha curcas* as a biofuel, animal feed and health products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89: 961-972.

NAIR, D.N.; SINGH, V.; SINGH, D.D. (2012). *Jatropha curcas* hemagglutinin is similar to a 2S albumin allergen from the same source and has unique sugar affinities. *Planta*, 236 (5)1499-505, DOI 10.1007/s00425-012-1702-2.

NG, K.S.; OOI, W.Y.; GOH, L.K.; SHENBAGARATHAI, R.; SUDESH, K. (2010). Evaluation of *Jatropha* oil to produce poly (3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* H16. *Polym Degrad Stabil*, 95: 1365-1369.

OLIVEIRA, N.D. (2009). Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epitopos alergênicos de albuminas 2S presentes em torta de mamona (*Ricinus communis* L.). Dissertação de mestrado em Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes – RJ - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF.

OPENSHAW, K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomasse Bioenergy*, 19: 1-15.

PANTOJA-UCEDA, D.; BRUIX, M.; GIMENEZ-GALLEGO, G.; RICO, M.; SANTORO, J. (2003). Solution structure of Ric C3, a 2S albumin storage protein from *Ricinus communis*. *Biochemistry*, 42: 13839-13847.

PANTOJA-UCEDA, D.; PALOMARES, O.; BRUIX, M.; VILLALBA, M.; RODRÍGUEZ, R.; RICO, M.; SANTORO, J. (2004). Solution structure and stability against digestion of rproBnlb, a recombinant 2S albumin from rapeseed: relationship to its allergenic properties. *Biochemistry*, 43: 16036-16045.

RAKSHIT, K.D.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. (2010). Nutritional, biochemical and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58:6543-6555.

REESE, G.; AYUSO, R.; LEONG-KEE, S.M.; PLANTE, M.J.; LEHRER, S.B. (2001). Characterization and identification of allergen epitopes: recombinant peptide libraries and synthetic, overlapping peptides. *Journal of Chromatography B*, 756: 157-163.

REGENTE, M.; de la CANAL, L. (2001). Are storage 2S albumin also defensive proteins? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59: 275-276.

RIBEIRO, S.F.; TAVEIRA, G.B.; CARVALHO, A.O.; DIAS, G.B.; DA CUNHA, M.; SANTA-CATARINA, C.; RODRIGUES, R.; GOMES, V.M. (2012). Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. *Protein Journal*, 31: 5967.

ROBOTHAMA, J.M.; HOFFMANA, G.G.; TEUBERB, S.S.; BEYERC, K.; SAMPSOND, H.A.; SATHEE, S.K.; ROUXA, K.H. (2009). Linear IgE-epitope mapping and comparative structural homologymodeling of hazelnut and English walnut 11S globulins. *Molecular Immunology*, 46: 2975-2984.

SALI, A.; BLUNDELL, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of cytology & molecular biology*, 234: 779-815.

SAMPSON, H.A. (2003). Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics*, 111: 1601-1608.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7) 945-956.

SHIN D.S.; COMPADRE, C.M.; MALEKI, S.J.; KOPPER, R.A.; SAMPSON, H.; HUANG, S.K. (1998). Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h 1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *Journal of biological chemistry*, 273: 13753-13759.

SICHERER, S.H.; SAMPSON, H.A. (2010). Food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125: S116-S125.

SILVA JR., J. G., Machado, O. L. T., Izumi, C. Padovan, J. C., Chait, B. T, Mirza, U. A., Greene, L. J. (1996) - Amino acid sequence of a new 2S Albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. *Biochemistry and Biophysics*, 336 (1): 10–18.

SCHULMEISTER, U.; HOCHWALLNER, H.; SWOBODA, I.; FOCKE-TEJKL, M.; GELLER, B. (2009). Cloning, expression, and mapping of allergenic determinants of alphaS1-casein, a major cow's milk allergen. *American journal of immunology*, 182: 7019-7029.

SCHWARTZ, L.B.; AUSTEN, K.F. (1980). Enzymes of the mast cell granules. *The Journal of investigative dermatology*, 74: 349-353.

SEGAL, D.M.; TAUROG, J.D.; METZGER, H. (1977). Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 2993-2997.

SHIN D.S.; COMPADRE, C.M.; MALEKI, S.J.; KOPPER, R.A.; SAMPSON, H.; HUANG, S.K. (1998). Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h 1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *Journal Biol Chemical*, 273: 13753-13759.

SINGH, R.A.; MUNISH, K.; HAIDEN, E. (2007). Synergistic cropping of summer groundnut with *Jatropha curcas* a new two-tier cropping system for Uttar Pradesh. *ICRISAT J 5*: 1-2.

SINGH, A.K.; RATH, S.K.; MISRA, K. (2001). Identification of epitopes in indian human papiloma virus 16 E6: A bioinformatics approach. *Journal of Virological Methods*, 177:26-30.

SIRVENT, S.; PALOMARES, O.; CUESTA-HERRANZ, J. (2012). Analysis of the structural and immunological stability of 2S albumin, nonspecific lipid transfer protein, and profilin allergens from mustard seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60: 6011-6018.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Analytical biochemistry*, 150:76-86.

STIRPE, F.; PESSION-BRIZZI, A.; LORENZONI, E.; STROCCJI, L.; MONTANARO, I.; SPERTI, S. (1976). Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. *Biochemistry Journal*, 156: 1-6.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22): 4673-4680.

THORPE, S.C.; KEMEDY, D.M.; PANZANI, R.C.; MC GULR, B.; LORD, M. (1988). Allergy to castor bean II - Identification of the major allergens in castor bean seeds. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 82: 67-72.

UNTERSMAJR, E., JAROLIM, E.J. (2006). Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacology & therapeutics*, 112: 787-798.

VALENTA, R.; FERREIRA, F.; FOCKE-TEJKI, M. (2010). From allergen genes to allergy vaccines. *International reviews of immunology*, 28: 211-241.

VENTER, C.; PEREIRA, B.; GRUNDY, J.; CLAYTON, C.B.; ROBERTS, G.; HIGGINS, B.; DEAN, T., (2006). Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. *Journal of allergy and clinical immunology*, 117: 1118-1124.

VIEIRA, M.R. (2002) Desgranulação de mastócitos por isoformas de albumina 2S de sementes de *R. communis*. Monografia - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil.

VYAS, D.K.; SINGH, R.N. (2007). Feasibility study of *Jatropha* seed husk as an open core gasifier feedstock. *Renew Energy*, 32: 512-517.

WESTRITSCHNIG, K.; FOCKE, M.; VERDINO, P.; GOESSLER, W.; KELLER, W.; TWARDOSZ, A. (2004). Generation of an allergy vaccine by disruption of the three dimensional structure of the cross-reactive calcium-binding allergen, Phl p 7. *American journal of immunology*, 172: 5684-92.

WOLFF, N.; YANNAI, S.; KARIN, N.; LEVY, Y.; REIFEN, R.; DALAL, I.; COGAN, U. (2004). Identification and characterization of linear B-cell epitopes of b-globulin, a major allergen of sesame seeds. *Journal of allergy and clinical immunology*, 114(5): 1151-1158.

ANEXOS

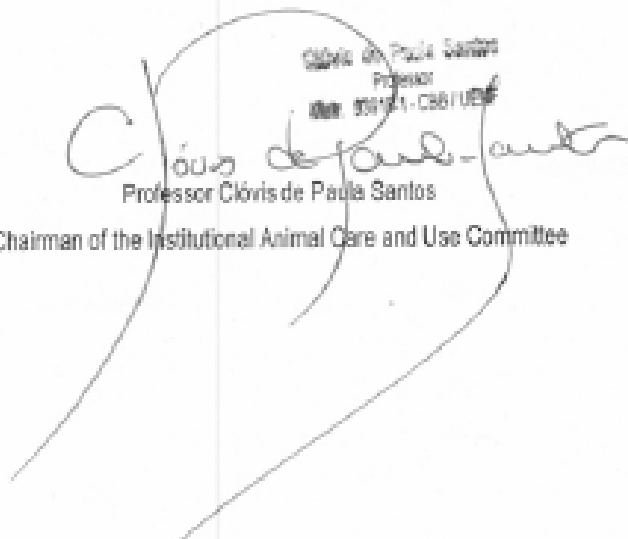
Anexo 1



Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICATION

We certify that the Protocol nº 112, entitled "CHARACTERIZATION OF ALLERGENIC PROTEINS FROM BLEAGINOUS" under the responsibility of Dr Olga Lima Tavares Machado, Center for Bioscience and Biotechnology /UENF is consistent with the ethical principles for animal experimentation adopted by Brazilian Society of Laboratory Animal Science / Brazilian College of Animal Experimentation (SBCAL / CÔBEA) and Federal law number 11,794. It is therefore approved and authorized. This program is licensed in this format and is valid until 21/12/2014.


 Clóvis de Paula Santos
 Professor
 Rua 201/11 - C861UEA
 Professor Clóvis de Paula Santos
 Chairman of the Institutional Animal Care and Use Committee