

**AVALIAÇÃO DO N-CARBAMIL-L-ÁCIDO GLUTÂMICO COMO POTENCIAL
BLOQUEADOR DA RESPOSTA ALÉRGICA MEDIADA POR IgE**

ANA FLÁVIA RIBEIRO MENDIETA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DO GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2026**

**AVALIAÇÃO DO N-CARBAMIL-L-ÁCIDO GLUTÂMICO COMO POTENCIAL
BLOQUEADOR DA RESPOSTA ALÉRGICA MEDIADA POR IgE**

ANA FLÁVIA RIBEIRO MENDIETA

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

Orientadora: Dr.^a Olga Lima Tavares Machado

**CAMPOS DO GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2026**

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M538

Mendieta, Ana Flávia Ribeiro.

"Avaliação do N-carbamil-L-ácido glutâmico como potencial bloqueador da resposta alérgica mediada por IgE". / Ana Flávia Ribeiro Mendieta. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

69 f. : il.

Bibliografia: 60 - 68.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.

Orientadora: Olga Lima Tavares Machado.

1. Alérgeno. 2. Inibição da IgE. 3. N-carbamil-L-ácido glutâmico. 4. Albumina 2S. 5. *Ricinus communis*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.


CDD - 570

AVALIAÇÃO DO N-CARBAMIL-L-ÁCIDO GLUTÂMICO COMO POTENCIAL BLOQUEADOR DA RESPOSTA ALÉRGICA MEDIADA POR IgE


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

Aprovada em 24 de novembro de 2026.


Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALBA LUCÍNIA PEIXOTO RANGEL GAMA**
Data: 02/03/2026 11:50:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Alba Lucínia Peixoto Rangel
(Dra. LBR - CBB - UENF)

Documento assinado digitalmente
 **MAURICIO AFONSO VERICIMO**
Data: 25/02/2026 16:06:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Mauricio Afonso Vericimo
(Dr. Departamento de Imunobiologia – Inst. Biologia - UFF)

Documento assinado digitalmente
 **FABRÍCIO MOREIRA ALMEIDA**
Data: 02/03/2026 15:47:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Fabrício Moreira Almeida
(Dr. LBR- CBB- UENF)

Documento assinado digitalmente
 **OLGA LIMA TAVARES MACHADO**
Data: 02/03/2026 13:06:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Olga Lima Tavares Machado -Orientadora
(Dra. LQFPP – CBB - UENF)

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

Apoio:

- UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro)
- FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
- CNPq (Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e tecnológico).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, proteção e sabedoria concedidas ao longo de toda a minha trajetória acadêmica, especialmente nos momentos de dificuldade e incerteza.

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), ao Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia (PGBB), pela oportunidade de realização deste trabalho, pela formação acadêmica e científica proporcionada e pelo suporte institucional ao longo de todo o mestrado.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Olga Lima Tavares Machado, primeiramente pela amizade cultivada ao longo desses sete anos, bem como pela orientação, confiança, incentivo constante e por todo o conhecimento compartilhado durante o desenvolvimento deste trabalho. A senhora foi fundamental para a minha trajetória acadêmica e profissional.

Agradeço à FAPERJ, à CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro, essencial para a execução desta pesquisa.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Prof.^a Dr.^a Alba Lucinia Peixoto Rangel, Prof. Dr. Maurício Vericimo e Dr. Fabrício Moreira Almeida, por aceitarem o convite para a avaliação deste trabalho, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições que certamente enriqueceram esta dissertação. Aos membros suplentes, Dr. Sanderson Dias Calixto e Dr.^a Natalia Oliveira, pela disponibilidade e colaboração.

Agradeço ao Dr. Sanderson Dias Calixto, pela revisão criteriosa, pelas correções e pelas sugestões que contribuíram significativamente para a clareza e o aprimoramento da versão final deste trabalho.

Agradeço aos professores, técnicos do biotério e colegas do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) Jucélia, Eduarda, Isabela, Raquel, Franciane e Raiza, pelo convívio, pelas contribuições científicas e pelo apoio durante a execução deste trabalho.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão por acreditar no meu potencial e estar sempre prontamente disposta a me auxiliar. Agradeço também à Dra. Yasmin Viana Martins e aos alunos de iniciação científica Fábio Hugo Siqueira Ferreira e Júlia Costa de Souza pela colaboração fundamental nos experimentos realizados no Laboratório do Reconhecer (LBR), pela troca de conhecimentos e pelo apoio ao longo dessa etapa do trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho e à residente Bruna Barreto Victorino Costa, do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), pelo suporte técnico e científico nas análises histológicas.

Agradeço ao Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra e à MSc. Amanda Mello da Silva Oliveira, do

Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), pela colaboração nas análises por microscopia eletrônica de transmissão.

Agradeço aos meus amigos do laboratório, Eduarda Ramos Contilho e Miguel Eduardo Salazar Aurich, pelo convívio diário, pelas trocas científicas, pelo apoio durante a realização dos experimentos e pelos momentos de descontração que tornaram a trajetória do mestrado mais leve e agradável.

Agradeço as minhas amigas de fora do ambiente acadêmico, Larissa Silva Cardoso, Gabriella Maria da Silva dos Santos, Camyla Freitas Viana e Ingrid Teixeira de Freitas pela amizade, compreensão e apoio ao longo dessa jornada, respeitando minhas ausências e estando presentes nos momentos de incentivo e descanso.

Agradeço ao meu noivo Artur Laterra Rodrigues, pelo amor, apoio incondicional e paciência ao longo de todo o período do mestrado, compreendendo minhas ausências e me incentivando nos momentos mais desafiadores.

Agradeço à toda minha família, em especial aos meus pais, Flávia Teixeira Ribeiro e Márcio Amante Mendieta, e à minha irmã, Maria Eduarda Ribeiro Mendieta, pelo amor, apoio constante, compreensão e incentivo em todos os momentos, sendo meu alicerce emocional ao longo de toda essa caminhada.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Doenças alérgicas.....	14
1.2. Mecanismos imunológicos da resposta alérgica mediada por IgE.....	16
1.3. Epítomos de ligação à IgE e reatividade cruzada entre alérgenos.....	19
1.4. <i>Ricinus communis</i> e o seu potencial alergênico	20
1.5. Abordagens terapêuticas atuais para o tratamento das doenças alérgicas.....	23
1.6. Estratégias terapêuticas baseadas no bloqueio da IgE	25
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Obtenção do antígeno e preparo da solução experimental.....	30
3.1.1. Obtenção da albumina 2S da semente de mamona.....	30
3.1.2. Preparo da solução de N-carbamil-L-ácido glutâmico	30
3.2. Caracterização do perfil toxicológico e inflamatório do N-carbamil-L-ácido glutâmico em macrófagos	30
3.2.1. Cultivo e tratamento celular.....	31
3.2.2. Avaliação da citotoxicidade.....	31
3.2.3. Quantificação de citocinas	32
3.2.4. Avaliação da produção de NO	32
3.2.5. Avaliação da atividade antioxidante	33
3.3. Avaliação do bloqueio de IgE <i>in vivo</i>	34
3.3.1. Experimentação animal.....	34
3.3.2. Grupos experimentais	34
3.3.3. Protocolo de sensibilização.....	35
3.3.4. Detecção de imunoglobulinas IgE e igG 1	37
3.3.5. Dosagem de IL-4 por ELISA.....	38
3.3.6. Teste cutâneo para Avaliação do Bloqueio de IgE (PCA).....	38
3.3.7. Registro fotográfico da resposta cutânea imediata	39
3.3.8. Coleta e processamento das patas.....	40
3.3.9. Processamento histológico para microscopia óptica.....	40
3.3.10. Processamento dos tecidos para microscopia eletrônica de transmissão.....	41
3.4. Análises estatísticas.....	42
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Caracterização do perfil toxicológico e inflamatório do N-Carb-Glu em macrófagos	42
4.1.1. Avaliação da citotoxicidade do N-Carb-Glu em macrófagos RAW 264.7	42
4.1.2. Efeito do N-Carb-Glu sobre a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 ...	43
4.1.3. Modulação da produção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 tratados com N-Carb-Glu.....	44
4.1.4. Efeito do N-Carb-Glu sobre a produção de IL-1 β em macrófagos J774A.1	45

4.1.5.	Avaliação da atividade antioxidante do N-Carb-Glu pelo método do DPPH.....	46
4.2.	Avaliação da resposta humoral induzida pela sensibilização com albumina 2S de mamona	47
4.2.1.	Detecção de IgE específica no soro de camundongos sensibilizados	47
4.2.2.	Detecção de IgG1 específica no soro de camundongos sensibilizados	48
4.2.3.	Avaliação da produção sistêmica de IL-4 após sensibilização com albumina 2S	49
4.3.	Avaliação do bloqueio de IgE <i>in vivo</i> pelo teste cutâneo (PCA)	50
4.3.1.	Resposta cutânea imediata induzida pela albumina 2S de mamona	50
4.4.	Avaliação morfológica da resposta cutânea	51
4.4.1.	Análise histológica das patas por microscopia óptica.....	51
4.4.2.	Avaliação ultraestrutural da resposta cutânea por microscopia eletrônica de transmissão	52
5.	DISCUSSÃO.....	54
6.	CONCLUSÃO	60
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Fatores ambientais e de estilo de vida associados ao aumento da prevalência das doenças alérgicas.	15
Figura 2. Mecanismos de reações alérgicas.....	17
Figura 3. Fórmula estrutural dos aminoácidos ácido glutâmico e N-carbamil-L-ácido glutâmico.....	28
Figura 4. Etapas do protocolo experimental empregadas na caracterização do perfil toxicológico e inflamatório do N-carbamil-L-ácido glutâmico em macrófagos	31
Figura 5. Cronograma do protocolo experimental de imunização	36
Figura 6. Representação fotográfica das etapas do protocolo de sensibilização e coleta de sangue em camundongos..	36
Figura 7. Registro fotografico das etapas do ensaio ELISA utilizado para a detecção de IgE e IgG1 em amostras de soro	37
Figura 8. Ilustração do procedimento do teste cutâneo utilizado neste estudo	39
Figura 9. Registro visual das etapas do processamento histológico para análise por microscopia óptica.....	41
Figura 10. Efeito do N-Carb-Glu na viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7	43
Figura 11. Efeito do N-Carb-Glu na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.....	44
Figura 12. Efeito do N-carbamil-L-ácido glutâmico na produção de TNF-a por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.....	45
Figura 13. Efeito do N-Carb-Glu em inibir a produção de IL-1 β em macrófagos murinos J774A.1	46
Figura 14. Avaliação da atividade antioxidante do N-Carb-Glu frente ao radical livre DPPH.....	47
Figura 15. Detecção de IgE específica anti-albumina 2S no soro de camundongos BALB/c antes (pré-sensibilização) e após (pós-sensibilização) o protocolo experimental	48
Figura 16. Detecção de IgG1 específica anti-albumina 2S no soro de camundongos BALB/c antes (pré-sensibilização) e após (pós-sensibilização) o protocolo experimental	49
Figura 17. Concentração sérica de IL-4 em camundongos BALB/c antes (pré-sensibilização) e após (pós-sensibilização) o protocolo experimental.	50
Figura 18. Fotografias representativas das patas de camundongos após o teste cutâneo com albumina 2S de mamona	51
Figura 19. Avaliação histológica da ativação mastocitária após desafio cutâneo	52
Figura 20. Microscopia Eletrônica de Transmissão do tecido da pata de animais controle (G1), sensibilizados com solução salina	53
Figura 21. Microscopia Eletrônica de Transmissão do tecido da pata de animais alérgicos sem tratamento (G2)	53
Figura 22. Microscopia Eletrônica de Transmissão do tecido da pata de animais alérgicos que receberam 1 tratamento (30 minutos antes do teste cutâneo – G3).....	54
Figura 23. Microscopia Eletrônica de Transmissão do tecido da pata de animais alérgicos que receberam 1 tratamento após o teste cutâneo (G4).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIT** – Imunoterapia alérgeno-específica
- APC** – Célula apresentadora de antígeno (*Antigen-Presenting Cell*)
- BHT** – 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DPPH** – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- ELISA** – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- FcεRI** – Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
- GBD** – *Global Burden of Disease Study*
- IL-1β** – Interleucina 1 beta
- IL-4** – Interleucina 4
- IL-5** – Interleucina 5
- IL-13** – Interleucina 13
- IL-33** – Interleucina 33
- ILC2** – Células linfoides inatas do tipo 2
- LBR** – Laboratório do Reconhecer
- LMPA** – Laboratório de Morfologia e Patologia Animal
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- MET** – Microscopia eletrônica de transmissão
- MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)
- MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
- N-Carb-Glu** – N-carbamil-L-ácido glutâmico
- NO** – Óxido nítrico
- OPD** – Orto-fenilenodiamina
- PCA** – Anafilaxia cutânea passiva (*Passive Cutaneous Anaphylaxis*)
- PBS** – Tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)
- PBS-T** – Tampão fosfato salino com Tween 20
- RNM** – Ressonância Nuclear Magnética
- SFB** – Soro fetal bovino
- Th** – Linfócitos T auxiliares (*T helper*)
- Th2** – Linfócitos T auxiliares do tipo 2
- TNF** – Fator de necrose tumoral

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TSLP – Linfopoiatina estromal tímica

VLP – Partículas semelhantes a vírus (*Virus-Like Particles*)

WRK – Reagente de Woodward (*Woodward's Reagent K*)

RESUMO

A prevalência de doenças alérgicas no mundo é crescente, o que gera preocupação devido ao impacto negativo que essas condições causam na vida dos indivíduos afetados. Atualmente, as abordagens terapêuticas mais empregadas para a alergia incluem o uso de anti-histamínicos e a imunoterapia; contudo, essas estratégias ainda apresentam limitações. A mamona (*Ricinus communis*) é uma oleaginosa que se destaca economicamente pela facilidade de cultivo e pela ampla aplicação do óleo extraído de suas sementes na indústria. Entretanto, a expansão do cultivo dessa planta amplia a exposição da população a alérgenos, principalmente às albuminas 2S, como Ric c1 e Ric c3, capazes de desencadear respostas alérgicas cruzadas com proteínas de diversas fontes. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que resíduos de ácido glutâmico presentes nos epítomos dos alérgenos Ric c1 e Ric c3 da mamona (*Ricinus communis*) estão diretamente envolvidos na ligação da IgE. Com base nesse conhecimento, o N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu), um aminoácido modificado análogo ao ácido glutâmico, foi identificado como um potencial bloqueador dessa interação. O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, um tratamento alternativo para a alergia, complementar ou potencialmente substitutivo aos anti-histamínicos e à imunoterapia, fundamentado no conhecimento dos epítomos de ligação à IgE, além de investigar o perfil toxicológico e inflamatório da substância N-Carb-Glu. Ensaio *in vitro* foram realizados em macrófagos murinos RAW 264.7 e J774A.1 para avaliar citotoxicidade, produção de óxido nítrico, atividade antioxidante e modulação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Os resultados demonstraram que o N-Carb-Glu apresentou baixa citotoxicidade e reduziu de forma significativa a produção de IL-1 β em macrófagos estimulados; entretanto, não modulou de forma significativa a produção de óxido nítrico nem apresentou atividade antioxidante. Nos ensaios *in vivo*, camundongos BALB/c foram sensibilizados com albumina 2S de *Ricinus communis*, resultando em aumento significativo dos níveis séricos de IgE, IgG1 e IL-4. A avaliação funcional do bloqueio de IgE foi realizada por meio do teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA), no qual a administração do N-Carb-Glu antes do desafio antigênico reduziu de forma evidente o extravasamento vascular e o edema cutâneo. As análises histológicas corroboraram esses achados, evidenciando menor ativação e degranulação mastocitária nos animais tratados previamente com o composto. Em conjunto, os resultados demonstram que o N-carbamil-L-ácido glutâmico apresenta perfil de segurança favorável e é capaz de atuar no bloqueio funcional da IgE *in vivo*, configurando-se como um candidato promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras no tratamento das doenças alérgicas, baseadas na interferência direta da interação IgE-alérgeno.

Palavras-chave: Alérgeno; Inibição da IgE; N-carbamil-L-ácido glutâmico; Albumina 2S; *Ricinus communis*.

ABSTRACT

The prevalence of allergic diseases worldwide has been increasing, raising concerns due to the negative impact these conditions have on the quality of life of affected individuals. Currently, the most commonly employed therapeutic approaches for allergy include the use of antihistamines and immunotherapy; however, these strategies still present limitations. Castor bean (*Ricinus communis*) is an oilseed crop of economic importance due to its ease of cultivation and the wide industrial application of the oil extracted from its seeds. However, the expansion of its cultivation increases population exposure to allergens, particularly 2S albumins such as Ric c1 and Ric c3, which are capable of triggering cross-reactive allergic responses with proteins from various sources. Previous studies from our group demonstrated that glutamic acid residues present in the epitopes of the allergens Ric c1 and Ric c3 from *Ricinus communis* are directly involved in IgE binding. Based on this knowledge, N-carbamyl-L-glutamic acid (N-Carb-Glu), a modified amino acid analogous to glutamic acid, was identified as a potential blocker of this interaction. The aim of this study was to evaluate, through in vitro and in vivo assays, an alternative treatment for allergy, complementary or potentially substitutive to antihistamines and immunotherapy, based on the knowledge of IgE-binding epitopes, as well as to investigate the toxicological and inflammatory profile of N-Carb-Glu. In vitro assays were performed using murine macrophages RAW 264.7 and J774A.1 to evaluate cytotoxicity, nitric oxide production, antioxidant activity, and modulation of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . The results demonstrated that N-Carb-Glu exhibited low cytotoxicity and significantly reduced IL-1 β production in stimulated macrophages; however, it did not significantly modulate nitric oxide production nor exhibit antioxidant activity. In vivo assays were conducted in BALB/c mice sensitized with 2S albumin from *Ricinus communis*, resulting in a significant increase in serum levels of IgE, IgG1, and IL-4. The functional evaluation of IgE blocking was performed using the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test, in which the administration of N-Carb-Glu prior to antigenic challenge markedly reduced vascular leakage and cutaneous edema. Histological analyses corroborated these findings, showing reduced mast cell activation and degranulation in animals previously treated with the compound. Taken together, the results demonstrate that N-carbamyl-L-glutamic acid presents a favorable safety profile and is capable of promoting functional IgE blocking in vivo, thus representing a promising candidate for the development of innovative therapeutic strategies for allergic diseases based on the direct interference with the IgE–allergen interaction.

Keywords: Allergen; IgE inhibition; N-carbamyl-L-glutamic acid; 2S albumin; *Ricinus communis*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças alérgicas

As doenças alérgicas são reações imunomediadas caracterizadas por respostas exacerbadas do sistema imunológico frente a antígenos ambientais geralmente inofensivos, denominados alérgenos. Essas respostas são classificadas como hipersensibilidade imediata do tipo I e são predominantemente mediadas pela imunoglobulina E (IgE), que desempenha papel central tanto na sensibilização quanto na fase efetora da resposta alérgica. As manifestações clínicas se expressam de diversos modos, dependendo dos tecidos afetados, e incluem erupções cutâneas, congestão sinusal, broncoconstrição com dificuldade respiratória, dor abdominal, diarreia e choque anafilático (ABBAS et al., 2019).

As doenças alérgicas têm se tornado um desafio crescente para a saúde pública global, com o aumento significativo de doenças como rinite alérgica, asma atópica e alergias alimentares nas últimas décadas. (REINMUTH-SELZLE et al., 2017).

Segundo estimativas do *Global Burden of Disease Study (GBD)*, em 2023 aproximadamente 362 milhões de pessoas apresentavam asma no mundo, correspondendo a cerca de 5% da população global. O cenário no Brasil nesse mesmo ano, mostrou que cerca de 17,9 milhões de indivíduos eram afetados por essa doença, o que representa uma prevalência aproximada de 9% da população brasileira, evidenciando a asma como um grande problema de saúde pública no contexto nacional.

Fatores como predisposição genética, mudanças no estilo de vida e alterações ambientais desempenham papel central no aumento da prevalência das doenças alérgicas. Evidências indicam que as mudanças climáticas e a poluição do ar não apenas aumentam a presença de alérgenos no ambiente, mas também intensificam a exposição humana a esses agentes, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento de respostas alérgicas. Além disso, alterações nos padrões alimentares, uso de antibióticos, modificações na microbiota intestinal e o avanço da urbanização têm sido associados a uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças alérgicas, reforçando a natureza multifatorial e complexa desse processo (REINMUTH-SELZLE et al., 2017; EDWARDS-SALMON et al., 2022). Esses fatores e suas interações estão esquematizados na **Figura 1**.

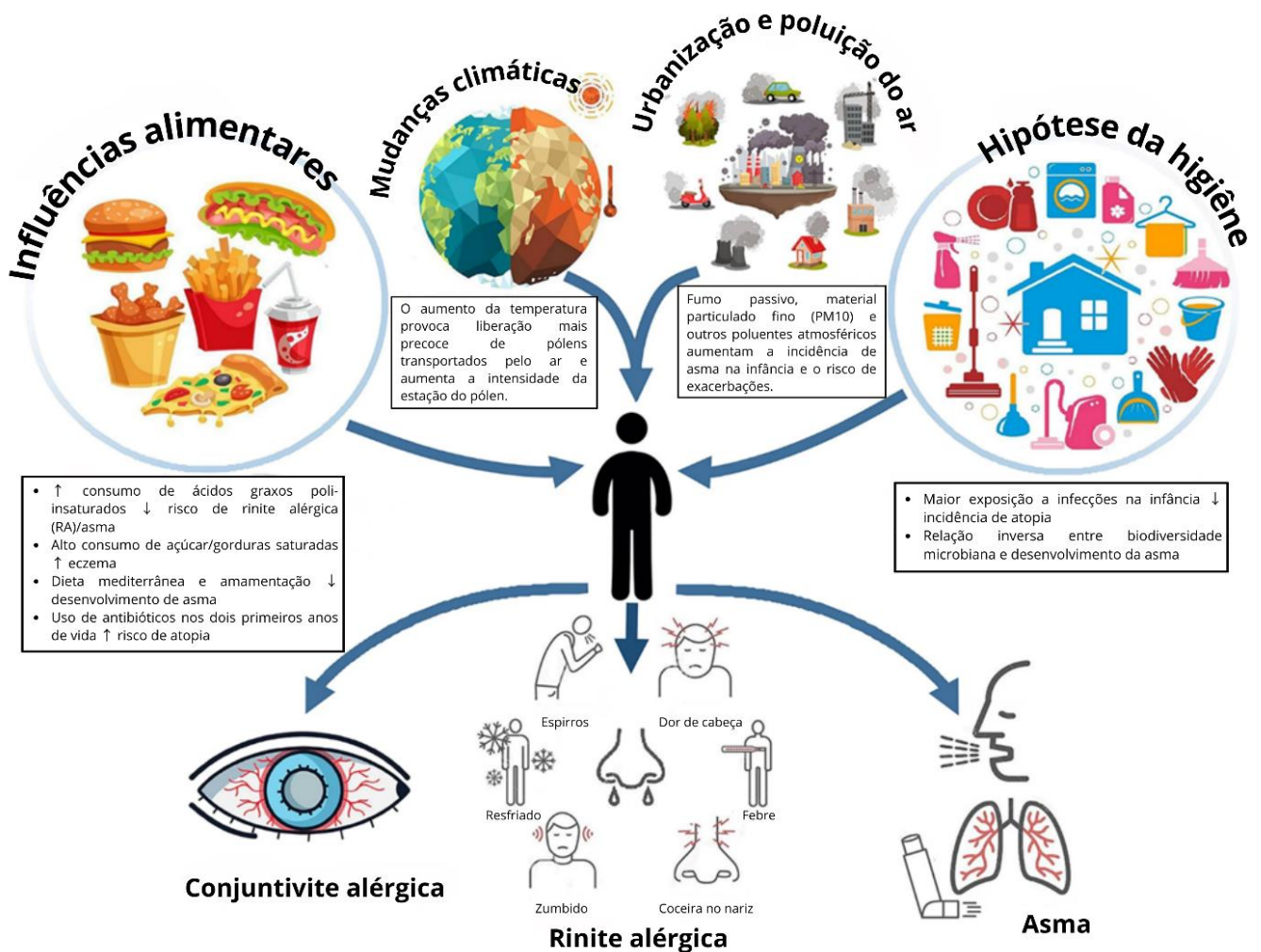


Figura 1. Fatores ambientais e de estilo de vida associados ao aumento da prevalência das doenças alérgicas. Representação esquemática da interação entre fatores ambientais, comportamentais e biológicos relacionados ao aumento da incidência de doenças alérgicas. Adaptado de Edwards-Salmon et al. (2022)

Embora as respostas alérgicas possam variar quanto aos estímulos desencadeadores e às manifestações clínicas, elas possuem características fundamentais. Uma dessas características é a produção de anticorpos IgE, que é um processo dependente da ativação de células T auxiliares (TH), produtoras de interleucina-4 (IL-4), uma citocina fundamental para o controle dessa resposta (ABBAS et al., 2019).

A IgE é capaz de reconhecer regiões específicas presentes no alérgeno, os epítopos. Apesar da especificidade de ligação alérgeno-IgE, podem ocorrer reações cruzadas entre a IgE e outras substâncias com epítopos multivalentes (IVANCIUC et al., 2009; BUFE, 2001).

Uma ocorrência alérgica acontece quando o indivíduo é exposto a um alérgeno, seja por contato direto com a pele, inalação ou ingestão. A alergia ocorre em duas fases principais: a fase de sensibilização, caracterizada pela indução de uma resposta do tipo Th2 e pela produção de IgE

específica, e a fase efetora, na qual a reexposição do alérgeno induz a ativação de mastócitos e a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pelos sintomas clínicos (GUNAWARDANA & DURHAM, 2018).

1.2. Mecanismos imunológicos da resposta alérgica mediada por IgE

As respostas alérgicas caracterizam-se como reações de hipersensibilidade do tipo I, nas quais a imunoglobulina E (IgE) exerce papel central tanto na fase de sensibilização quanto na fase efetora. Esses processos envolvem uma interação coordenada entre componentes do sistema imunológico inato e adaptativo, culminando na ativação de mastócitos e na liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pelas manifestações clínicas das doenças alérgicas (ABBAS et al., 2019; HOLGATE & POLOSA, 2008).

A alergia pode se desenvolver em duas fases, a fase de sensibilização e memória e a fase efetora, que pode ser subdividida em respostas imediatas e tardias. O contato inicial do indivíduo com o alérgeno marca a fase de sensibilização, que ativa o sistema de defesa ao detectar a presença do alérgeno, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 33 (IL-33), linfopoiatina estromal tímica (TSLP), fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1 β por meio das células epiteliais (AHMAD et al., 2018). Esses mediadores químicos recrutam e ativam células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) e basófilos, que passam a produzir IL-4 e IL-13, criando um ambiente imunológico denominado fenótipo pró-alérgico, que favorece o desenvolvimento das alergias. Além disso, essas citocinas recrutaram células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos ou células dendríticas (DC), que internalizam e processam o alérgeno, gerando fragmentos peptídicos conhecidos como epítomos, os quais são expostos na membrana das APCs associados ao complexo MHC de classe II (GUNAWARDANA & DURHAM, 2018).

Os epítomos do alérgeno são apresentados para os linfócitos T helper 'naive' (TH), que, sob a influência da IL-4, se diferenciam em células TH2. As células TH2 ativadas produzem grandes quantidades de citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13, que estimulam os linfócitos B a produzir anticorpos IgE específicos. As IgE produzidas e liberadas pelos plasmócitos se ligam aos receptores específicos (Fc ϵ RI) presentes na superfície de mastócitos nos tecidos e basófilos circulantes no sangue, caracterizando a primeira sensibilização (GUNAWARDANA & DURHAM, 2018; HOLGATE & POLOSA, 2008). Na reexposição ao mesmo alérgeno, ocorre a ligação cruzada entre as IgEs inseridas nos mastócitos e os epítomos do alérgeno, desencadeando a desgranulação celular e a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina e citocinas, que são responsáveis pelos sintomas típicos das reações alérgicas (GUNAWARDANA & DURHAM, 2018). A **Figura 2**

esquemata o processo das respostas alérgicas mediadas por IgE.

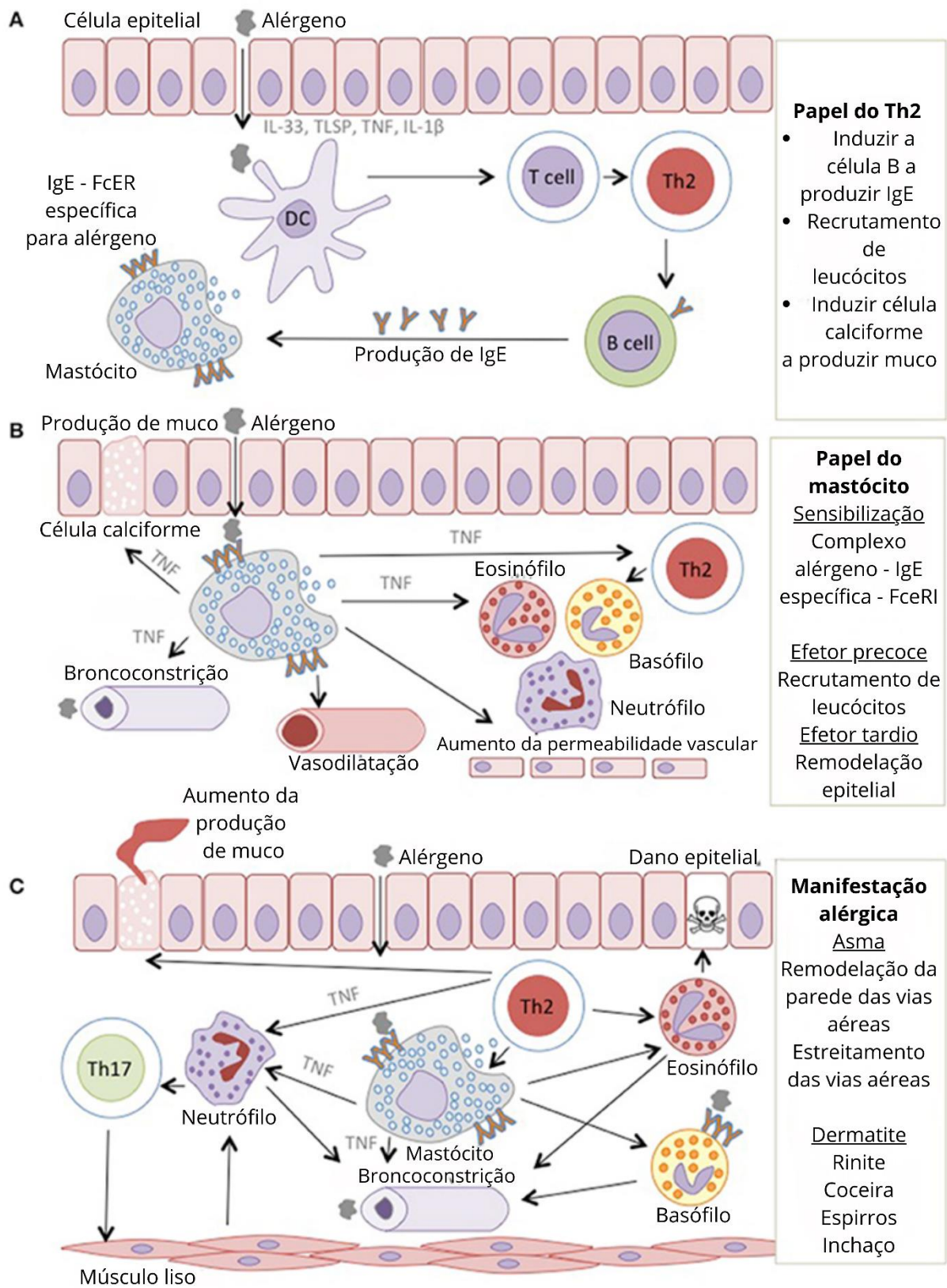


Figura 2. Mecanismos de reações alérgicas. (A) Na fase de sensibilização, o alérgeno ambiental sensibilizou as células epiteliais e liberou citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF. O alérgeno é absorvido pelas DCs, que são reguladas e produzidas por TNF, induz células Th2 e conduzem a síntese de IgE e, posteriormente,

produzem um pool de memória de células T e B específicas do alérgeno **(B)**. O próximo encontro com o alérgeno induz a montagem com o complexo IgE-FcεRI específico do antígeno em mastócitos que secretam TNF e, posteriormente, recrutam leucócitos. Os leucócitos; basófilos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos interagem entre si para produzir mais muco **(C)**. Na fase efetora tardia, a remodelação epitelial exibirá a manifestação alérgica, pois em pacientes asmáticos e rinite, a parede das vias aéreas é estreitada e o muco é superproduzido, enquanto em pacientes com dermatite, a vasodilatação resulta em coceira e inchaço da pele.

Fonte: Adaptado de AHMAD et al. (2018)

1.3. Epítos de ligação à IgE e reatividade cruzada entre alérgenos

Epítos são regiões específicas localizadas na superfície das proteínas capazes de interagir diretamente com anticorpos, constituindo os determinantes estruturais do reconhecimento imunológico. No contexto das reações alérgicas mediadas por imunoglobulina E (IgE), os epítos de ligação à IgE desempenham papel central, uma vez que a resposta alérgica e a subsequente inflamação são desencadeadas quando o alérgeno promove a ligação cruzada de, no mínimo, duas moléculas de IgE previamente ligadas ao receptor de alta afinidade FcεRI presente na superfície de células efectoras, como mastócitos e basófilos. Essa interação é altamente específica e depende do reconhecimento de epítos expostos na superfície do alérgeno pelo sítio variável do anticorpo. Do ponto de vista estrutural, a superfície proteica representa o nível de organização mais diretamente relacionado à ligação de anticorpos, sendo o epítoto a porção dessa superfície que interage com o anticorpo em nível molecular. Dessa forma, a compreensão da estrutura dos epítos e dos determinantes envolvidos na ligação à IgE é fundamental para o entendimento da resposta alérgica e pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras (AALBERSE, 2000; BUFE, 2001).

Os epítos de ligação à IgE são classificados em epítos lineares (ou sequenciais), formados por resíduos contínuos de aminoácidos, e epítos conformacionais (ou descontínuos), os quais dependem da conformação tridimensional da proteína para o reconhecimento pelo anticorpo.

A reatividade cruzada entre alérgenos ocorre quando anticorpos IgE gerados contra um determinado alérgeno reconhecem estruturas semelhantes presentes em outras proteínas, sendo esse fenômeno fortemente dependente da similaridade estrutural dos epítos expostos na superfície proteica. A presença de dobras tridimensionais semelhantes e de propriedades físico-químicas compatíveis entre regiões epítoto-anticorpo tem maior relevância para a reatividade cruzada do que a identidade de sequência primária isoladamente (AALBERSE, 2000).

Diversas proteínas alergênicas compartilham características estruturais que favorecem sua estabilidade e persistência imunológica, incluindo estruturas compactas e resistência à degradação, fatores que contribuem para a manutenção da capacidade de ligação à IgE e para a reatividade cruzada entre alérgenos (BUFE, 2001; BREITENEDER & RADAUER, 2004).

Estudos baseados no mapeamento de epítos de ligação à IgE demonstraram que pequenas modificações na composição de epítos lineares podem resultar em alterações significativas na afinidade da IgE por seus alérgenos. Análises quantitativas indicam que variações pontuais nas propriedades físico-químicas de resíduos presentes nesses epítos são suficientes para reduzir ou abolir a capacidade de ligação da IgE, evidenciando a sensibilidade dessa interação a mudanças estruturais discretas (IVANCIUC et al., 2009).

A identificação e caracterização estrutural de epítomos de ligação à IgE têm sido apontadas como etapas fundamentais para a compreensão da alergenicidade e para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas futuras (BUFE, 2001; BREITENEDER & RADAUER, 2004).

1.4. *Ricinus communis* e o seu potencial alergênico

Ricinus communis, mais conhecida como mamona, é uma planta oleaginosa de grande importância econômica, pertencente à família Euphorbiaceae. O óleo extraído de suas sementes é rico em ácido ricinoleico, que representa cerca de 90% de sua composição. Esse componente possui uma ampla gama de aplicações industriais, sendo utilizado na produção de biodiesel, plásticos, fibras sintéticas, esmaltes, resinas e lubrificantes (CANGEMI, 2010). Além disso, essa planta apresenta um alto valor comercial e é adaptável a condições ambientais adversas, o que favorece seu cultivo em regiões tropicais e subtropicais (XU et al., 2019). No Brasil, a mamona é extensivamente cultivada, especialmente na região de Irecê, na Bahia. Cerca de 120 toneladas de sementes são processadas diariamente pela Azevedo Óleos, atualmente Oleon Brasil, localizada em Divinópolis, Móoca, no Estado de São Paulo.

As albuminas 2S, presentes nas sementes da mamona, são proteínas de reserva vegetal que desempenham um papel crucial no armazenamento de nutrientes, e também estão associadas a funções de defesa, como atividades antifúngicas e inibidoras de proteases. A capacidade alergênica da mamona tem sido amplamente investigada pelo nosso grupo de pesquisa, desde 1992 (MACHADO e SILVA, 1992). Entre os principais alérgenos da mamona estão as proteínas Ric c1 e Ric c3. Essas proteínas são formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto que são sintetizadas a partir de um único precursor com 237 resíduos de aminoácidos (MACHADO e SILVA, 1992; IRWIN et al., 1990). Durante o processamento, alguns peptídeos são eliminados, originando as proteínas nativas Ric c1 e Ric c3.

A estrutura tridimensional de Ric c3 foi determinada utilizando Ressonância Nuclear Magnética (RNM) e descrita por Pantoja-Uceda et al. em 2004. A estrutura tridimensional de Ric c1 foi proposta, por modelagem molecular, por Nascimento et al., 2011.

Devido à similaridade estrutural com outros alérgenos, como os encontrados em sementes de amendoim, soja e no pólen presente na poeira doméstica, as albuminas 2S de mamona têm o potencial de desencadear reações alérgicas em indivíduos previamente sensibilizados. Segundo Breiteneder e Radauer (2004), essa propriedade está relacionada à presença de epítomos que podem ser reconhecidos por IgEs específicas. Essa semelhança é geralmente mediada por epítomos lineares compartilhados, que são regiões específicas das proteínas capazes de serem reconhecidas pelas IgEs, mesmo quando os alérgenos têm origens distintas (AALBERSE, 2000; MORENO & CLEMENTE,

2008).

Em 2002, Vieira observou que Ric c1 e Ric c3, mesmo após desnaturação, ainda eram capazes de induzir a desgranulação de mastócitos, evidenciando a presença de epítomos contínuos nessas proteínas. Posteriormente, Felix et al. (2008) produziram peptídeos sintéticos baseados nessas sequências e identificaram a presença recorrente de pelo menos dois resíduos de ácido glutâmico separados por uma distância de três a nove aminoácidos nos epítomos reconhecidos por IgE. Essas observações levantaram a hipótese de que os resíduos de ácido glutâmico poderiam desempenhar um papel relevante na interação entre IgE e os alérgenos Ric c1 e Ric c3, motivando a investigação funcional desses resíduos.

Com base nessa hipótese, Deus-de-Oliveira et al. (2011) realizaram ensaios *in vitro* utilizando os peptídeos sintéticos previamente descritos por Felix et al. (2008), com o objetivo de avaliar a importância dos resíduos de ácido glutâmico na ligação da IgE aos alérgenos Ric c1 e Ric c3. A desgranulação dos mastócitos provocada pelos alérgenos nativos, pelos alérgenos desnaturados, por suas subunidades isoladas ou pelos peptídeos sintetizados era da mesma ordem de grandeza. Para investigar a importância dos resíduos de ácido glutâmico para a desgranulação dos mastócitos, Carrielo-Gama (2006), tratou os peptídeos sintéticos com o reagente Woodward's Reagent K (WRK), um composto específico para modificações de aminoácidos dicarboxílicos, como o ácido glutâmico e o ácido aspártico. Após o tratamento com WRK, observou-se uma redução acentuada da desgranulação de mastócitos para níveis próximos ao controle negativo, demonstrando que os resíduos dicarboxílicos, especialmente o ácido glutâmico, desempenham papel essencial tanto na ligação da IgE quanto na capacidade dos epítomos de Ric c1 e Ric c3 de induzir resposta alérgica. Para confirmar essas observações, novos peptídeos foram sintetizados, trocando um dos resíduos de ácido glutâmico por resíduos de leucina. Esses peptídeos não desencadearam desgranulação dos mastócitos previamente se sensibilizados, tornando claro a necessidade de pelo menos dois resíduos de ácido glutâmico por epítomo ligante de IgE.

Com base na demonstração de que pelo menos dois resíduos de ácido glutâmico, distantes entre três a nove posições, presentes em epítomos ligantes de IgE, são críticos para a ligação cruzada na IgE e posterior desgranulação dos mastócitos, Deus-de-Oliveira et al. (2011) investigaram se aminoácidos livres poderiam atuar no bloqueio dessa interação por meio de um mecanismo competitivo. Para isso, foram realizados ensaios *in vitro* empregando mastócitos sensibilizados com soro de rato, pré-imunizados com albuminas 2S ou com soro humano de pacientes atópicos alérgicos à mamona ou amendoim. Mastócitos sensibilizados com soros previamente incubados com ácido glutâmico ou ácido aspártico livre, foram expostos aos alérgenos Ric c1, Ric c3 ou aos peptídeos sintéticos correspondentes aos epítomos ligantes de IgE. Os resultados demonstraram que o tratamento

com esses aminoácidos dicarboxílicos reduziu para níveis basais, como no controle a desgranulação dos mastócitos e a liberação de histamina, enquanto aminoácidos neutros ou básicos não apresentaram efeito bloqueador, confirmando a especificidade dos resíduos dicarboxílicos no bloqueio da resposta alérgica mediada por IgE.

Na sequência, os autores avaliaram se esses mesmos determinantes moleculares estariam envolvidos em fenômenos de reatividade cruzada. Para isso, foram realizados ensaios *in vitro* nos quais mastócitos peritoneais de rato previamente sensibilizados com IgE anti-2S albumina foram incubados com extratos comerciais de alérgenos alimentares e inaláveis comumente utilizados no diagnóstico clínico. Os resultados evidenciaram desgranulação significativa (>50%) quando os mastócitos foram estimulados com extratos de camarão, peixe, glúten, trigo, soja, amendoim, milho, poeira doméstica, tabaco e fungos do ar, indicando forte reatividade cruzada entre esses alérgenos e os alérgenos de *Ricinus communis*. Epítopos ligantes de IgE normalmente estão localizados em regiões expostas da proteína alergênica. Embora os alérgenos que apresentaram reatividade cruzada com as albuminas 2S (mistura de Ric c1 e Ric c3) possuam baixa similaridade estrutural com os principais alérgenos da mamona, os epítopos ligantes de IgE que contêm dois resíduos de ácido glutâmico essenciais para essa interação permanecem expostos na proteína nativa.

Lodi (2023) e Lodi e col (2024) mostraram por estudos de modelagem molecular e por estudos “*in silico*” de previsão de epítopos, que os epítopos ligantes de IgE de alérgenos, pertencentes à classe das albuminas 2S, de oleagionosas comestíveis como amendoim, castanha do Pará, gergelim, pistache e castanha de caju estão em loops externos. Lodi, demonstrou ainda que as estruturas tridimensionais dos alérgenos pertencentes à classe das albuminas 2S mencionadas acima se assemelham às estruturas de Ric c1 e de Ric c3, não somente no que se refere aos epítopos ligantes de IgE, mas também nas posições dos epítopos de células B e de células T. A importância da similaridade estrutural para desencadear a reatividade cruzada entre alérgenos em indivíduos previamente sensibilizados relacionada à presença de epítopos compartilhados capazes de serem reconhecidos por IgEs específicas foi descrita por diferentes pesquisadores, podemos citar Breiteneder & Radauer, 2004, Aalberse, 2000; Moreno & Clemente, 2008.

Após evidenciar o envolvimento de pelo menos dois resíduos de ácido glutâmico próximos no epítipo ligante de IgE propusemos a pré-incubação do soro anti albuminas 2S com ácido glutâmico ou ácido aspártico. Deus-de-oliveira 2011 e col, demonstraram que esse tratamento reduziu a desgranulação de mastócitos a valores próximo ao controle negativo. Em conjunto, esses achados sustentam abordagens terapêuticas baseadas no bloqueio da IgE, uma vez que alérgenos da classe das albuminas 2S, compartilham propriedades estruturais semelhantes, ampliando o potencial para o desenvolvimento de estratégias inovadoras no tratamento de alergias (Machado et al., PI0506648).

1.5. Abordagens terapêuticas atuais para o tratamento das doenças alérgicas

As abordagens terapêuticas para o tratamento das doenças alérgicas incluem, de modo geral, medidas para evitar o alérgeno, farmacoterapia e estratégias imunomodulatórias, entre as quais se destacam a imunoterapia alérgeno-específica (AIT) e as terapias biológicas direcionadas a alvos específicos da resposta imune do tipo 2. Enquanto a farmacoterapia permanece fundamental para o controle dos sintomas, abordagens imunomodulatórias vêm ganhando destaque por seu potencial de modificar mecanismos envolvidos na fisiopatologia da alergia (DURHAM & SHAMJI, 2022; BOURSIQUOT et al., 2024).

A farmacoterapia é a base do manejo clínico das doenças alérgicas e inclui principalmente o uso de anti-histamínicos, corticosteroides e broncodilatadores, de acordo com a manifestação clínica. Os anti-histamínicos atuam por meio do bloqueio dos receptores H1 da histamina, reduzindo os efeitos inflamatórios causados por esse mediador. Os anti-histamínicos de primeira geração, como a Hidroxizina, apresentam meia-vida curta e maior penetração no sistema nervoso central, estando associados a efeitos adversos como sedação, enquanto os de segunda geração, como a Loratadina, possuem maior seletividade periférica, menor lipossolubilidade e melhor perfil de segurança, permitindo esquemas posológicos mais convenientes (CAMELO-NUNES, 2006). Apesar de eficazes no controle dos sintomas, as terapias farmacológicas convencionais não promovem modulação imunológica duradoura nem alteram o curso natural da doença alérgica (DURHAM & SHAMJI, 2022).

Diferentemente da farmacoterapia tradicional, que atua predominantemente no alívio dos sintomas, a imunoterapia alérgeno-específica (AIT) interfere diretamente nos mecanismos imunológicos da doença alérgica e pode promover tolerância de longo prazo ao alérgeno. Essa estratégia baseia-se na administração repetida e controlada do alérgeno ou de seus componentes, levando à supressão da resposta Th2 patológica, à indução de células T reguladoras e à produção de anticorpos bloqueadores, como IgG4 e IgA, capazes de competir com a IgE pela ligação ao alérgeno (DURHAM & SHAMJI, 2022; BOURSIQUOT et al., 2024).

Apesar de seu potencial terapêutico, a AIT convencional apresenta limitações relacionadas à heterogeneidade dos extratos alergênicos, à duração prolongada do tratamento e ao risco de reações adversas. Nesse contexto, abordagens baseadas em alérgenos definidos, como a utilização de proteínas recombinantes bem caracterizadas, têm sido investigadas como alternativas mais padronizadas e seguras. Um exemplo é a imunoterapia utilizando o alérgeno recombinante Alt a 1, que demonstrou eficácia clínica e perfil de segurança favorável em pacientes com alergia a fungos,

reforçando o potencial da AIT com alérgenos molecularmente definidos (TABAR et al., 2019).

Nesse contexto, avanços adicionais incluem o desenvolvimento de alérgenos recombinantes mutantes hipoalergênicos, que representam uma estratégia promissora para aumentar a segurança e a previsibilidade da imunoterapia alérgeno-específica. Esses alérgenos são obtidos por meio de mutações dirigidas em resíduos críticos envolvidos na ligação à IgE, resultando em moléculas com alergenicidade reduzida, mas capazes de preservar propriedades estruturais e imunogênicas essenciais para a indução de tolerância imunológica. Estudos conduzidos pelo nosso grupo com albuminas 2S de *Ricinus communis* demonstraram esse potencial por meio de abordagens complementares. O trabalho de Pacheco-Soares e col. (2018) evidenciou que mutações dirigidas em epítomos de ligação à IgE do alérgeno Ric c1 promovem redução significativa da desgranulação de mastócitos e da reatividade mediada por IgE, sem comprometer a estabilidade estrutural e funções biológicas da proteína. De forma complementar, os estudos de Bartholazzi (2018) e Bartholazzi (2022), utilizando o alérgeno Ric c3, aprofundaram a caracterização imunológica dessas estratégias, demonstrando a preservação da imunogenicidade e o potencial de modulação da resposta imune com menor ativação de vias IgE-dependentes. Em conjunto, esses achados reforçam o uso de alérgenos mutantes bem definidos como ferramentas moleculares promissoras para o aprimoramento da AIT.

Além disso, paralelamente ao aprimoramento da AIT, o avanço no entendimento da imunopatogênese das doenças alérgicas possibilitou o desenvolvimento de terapias biológicas baseadas em anticorpos monoclonais, consolidando abordagens terapêuticas mais direcionadas para o tratamento das alergias moderadas a graves. Esses imunobiológicos atuam por meio do bloqueio de alvos específicos da hipersensibilidade do tipo I e têm sido associados à melhora do controle clínico, à redução de exacerbações e ao impacto positivo na qualidade de vida dos pacientes (ASBAI, 2023; MINGOMATAJ et al., 2024).

A terapia anti-IgE representa uma abordagem biológica bastante consolidada no tratamento das doenças alérgicas moderadas a graves, especialmente aquelas mediadas por inflamação do tipo 2. O omalizumabe, anticorpo monoclonal IgG1 humanizado, atua ligando-se à imunoglobulina E (IgE) livre, mais especificamente à região Cε3 da IgE, impedindo sua interação com os receptores de alta afinidade FcεRI presentes na superfície de mastócitos e basófilos, bem como com o receptor de baixa afinidade CD23 expresso em células apresentadoras de antígeno. Como consequência, ocorre redução progressiva da expressão de FcεRI na superfície das células efetoras, diminuição da ativação mastocitária e basofílica e atenuação da liberação de mediadores inflamatórios envolvidos nas reações alérgicas imediatas. Além disso, a neutralização da IgE circulante contribui para a modulação da resposta inflamatória crônica, com impacto clínico na redução de exacerbações, melhora do controle da doença e da qualidade de vida dos pacientes (HOLGATE et al., 2005).

Além da terapia anti-IgE, estratégias imunoterapêuticas baseadas em epítopos específicos têm sido investigadas com o objetivo de reduzir a reatividade mediada por IgE, mantendo a capacidade imunogênica e aumentando a segurança do tratamento. Nesse contexto, vacinas compostas por peptídeos contendo epítopos de células B demonstraram potencial para induzir anticorpos bloqueadores sem promover ligação cruzada de IgE, representando uma abordagem promissora para a imunoterapia alérgeno-específica (ZIEGLMAYER et al., 2016). De forma complementar, imunoterapias baseadas em epítopos de células T também têm sido exploradas visando a indução de tolerância imunológica por meio da modulação seletiva de respostas celulares, embora seus efeitos clínicos ainda estejam em avaliação (RAMCHANDANI et al., 2021).

Outra estratégia envolve o uso de alérgenos acoplados a plataformas imunogênicas, como partículas semelhantes a vírus (virus-like particles, VLPs), que permitem alta imunogenicidade associada à redução da atividade alérgica. Essa abordagem tem se mostrado promissora para o desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes, embora desafios técnicos relacionados à produção e escalonamento ainda persistam (ENGEROFF et al., 2018).

Dessa forma, apesar dos avanços proporcionados pelas terapias atualmente disponíveis, a busca por estratégias capazes de atuar de maneira mais específica sobre os mecanismos moleculares da interação alérgeno-IgE permanece como um campo ativo de investigação. Intervenções que visem modular diretamente essa interação apresentam grande potencial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras.

1.6. Estratégias terapêuticas baseadas no bloqueio da IgE

Considerando o papel central da imunoglobulina E (IgE) na fisiopatologia das doenças alérgicas, estratégias terapêuticas direcionadas ao bloqueio dessa imunoglobulina ou à interrupção de sua interação com receptores celulares têm se destacado como abordagens promissoras para o tratamento da alergia. Diferentemente das terapias convencionais, que atuam predominantemente no controle dos sintomas, as estratégias baseadas no bloqueio da IgE interferem em eventos iniciais e fundamentais da cascata alérgica, especialmente no eixo IgE-FcεRI-mastócito, com potencial para reduzir a ativação celular e a amplificação da resposta alérgica (ABBAS et al., 2019; LIU et al., 2025).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido uma abordagem inovadora baseada no bloqueio de IgE, fundamentada no conhecimento detalhado sobre os epítopos ligantes de IgE presentes nos alérgenos da classe das albuminas 2S de mamona. Essa estratégia teve como ponto de partida a caracterização estrutural dos alérgenos Ric c1 e Ric c3, isoformas pertencentes à classe das albuminas 2S (MACHADO et al., 1992; MACHADO et al., 2003). Estudos prévios

caracterizaram os epítomos envolvidos na interação com IgE (FELIX et al., 2008) e identificaram resíduos de ácido glutâmico como elementos essenciais nessa ligação (DEUS-DE-OLIVEIRA et al., 2011).

O glutamato (L-Glu) é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central dos mamíferos e participa de processos fundamentais como a plasticidade sináptica, cognição e memória (NICIU et al., 2014; PRYBYLOWSKI & WENTHOLD, 2004). Entretanto, seu uso terapêutico sistêmico é limitado, uma vez que alterações em sua biodisponibilidade podem interferir na neurotransmissão excitatória e em processos dependentes da sinalização glutamatérgica, justificando a busca por derivados estruturalmente relacionados.

Nesse cenário, Campos-Mesquita (2016) avaliou o bloqueio da IgE por meio do uso de diferentes derivados do ácido glutâmico. Foram investigados cinco ácidos glutâmicos modificados: D-ácido glutâmico, N-metil-L-ácido glutâmico, N-acetil-L-ácido glutâmico, N-(4-nitrobenzoi)-L-ácido glutâmico e N-carbamil-L-ácido glutâmico, com o objetivo de identificar compostos capazes de interferir na interação IgE–alérgeno. Por meio de ensaios *in vitro* baseados em ELISA, utilizando soros de camundongos imunizados com albumina 2S de mamona, observou-se que os análogos N-(4-nitrobenzoi)-L-ácido glutâmico e N-carbamil-L-ácido glutâmico se destacaram por apresentar maior eficiência no bloqueio da ligação IgE–alérgeno, alcançando percentuais superiores a 90% de inibição nas maiores concentrações avaliadas, o que os tornou os principais candidatos para os estudos subsequentes.

A partir desses resultados *in vitro*, Campos Mesquita (2020) e de Campos-Mesquita (2023) avançou na validação dessa estratégia terapêutica por meio da avaliação do bloqueio da IgE em modelos *in vivo* de alergia. Nesse estudo, foi testado especificamente o N-(4-nitrobenzoi)-L-ácido glutâmico como agente bloqueador de IgE *in vivo*, em camundongos BALB/c sensibilizados com proteínas do leite de vaca e com albuminas 2S de *Ricinus communis*. O tratamento com esse derivado resultou em redução significativa dos sinais clínicos da reação alérgica e da interação IgE–alérgeno. Paralelamente, foram conduzidos testes comportamentais e de coordenação motora, incluindo avaliações de atividade locomotora, equilíbrio e resposta motora, com o objetivo de investigar possíveis efeitos excitatórios ou neurológicos adversos. Os resultados demonstraram ausência de alterações comportamentais ou motoras significativas até doses de até 30 mg/kg, reforçando a viabilidade do uso desse composto como bloqueador de IgE.

Como desdobramento desses estudos, o trabalho desenvolvido por Mendieta (2023) teve como foco a investigação do N-carbamil-L-ácido glutâmico como alternativa terapêutica para o bloqueio da IgE *in vivo*. Nesse estudo, camundongos BALB/c foram submetidos a ensaios *in vivo* com o objetivo de avaliar a segurança do composto, incluindo análises toxicológicas e comportamentais. A

avaliação toxicológica envolveu a análise histopatológica de fígado e rins de animais submetidos ao tratamento com o composto por 15 dias consecutivos, bem como a dosagem de marcadores séricos de função hepática e renal. Adicionalmente, foram realizados testes comportamentais para a investigação de possíveis efeitos excitatórios, sedativos ou motores, por meio da avaliação da atividade locomotora e da coordenação motora. Os resultados demonstraram que a administração do N-carbamil-L-ácido glutâmico, em doses de até 50 mg/kg, não promoveu alterações histopatológicas ou bioquímicas significativas, nem interferiu no comportamento ou na atividade motora dos animais, reforçando o potencial desse derivado como candidato seguro e promissor para estratégias terapêuticas baseadas no bloqueio da IgE (MENDIETA, 2023).

A relevância dessa abordagem terapêutica vai além dos alérgenos da mamona, uma vez que o bloqueio da interação IgE–alérgeno pode representar uma estratégia preventiva aplicável a diferentes fontes alergênicas. Nesse contexto, destaca-se que grande parte das reações alérgicas alimentares em humanos está associada a um grupo restrito de alimentos conhecidos como os “*big nine allergens*”, que incluem leite, ovo, amendoim, nozes, trigo, soja, peixe, crustáceos e gergelim (JANKOVIC et al., 2023). Os principais alérgenos desses alimentos pertencem à classe das albuminas 2S e contêm resíduos de ácido glutâmico nos epitopos ligantes de IgE (LODI, 2023). Esses alérgenos compartilham a capacidade de induzir respostas mediadas por IgE e de ativar mastócitos e basófilos, desencadeando reações alérgicas sistêmicas. Assim, estratégias terapêuticas baseadas no bloqueio da IgE, como a proposta neste trabalho, apresentam potencial para serem exploradas em um contexto mais amplo, independentemente da origem do alérgeno, reforçando o caráter inovador e preventivo dessa abordagem no tratamento das doenças alérgicas.

No presente estudo, foi realizada uma avaliação toxicológica e inflamatória do N-carbamil-L-ácido glutâmico (**Figura 3.**) em macrófagos, além da investigação de sua eficácia no bloqueio da IgE em modelos *in vivo*, visando contribuir para o avanço do desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras no tratamento das doenças alérgicas.

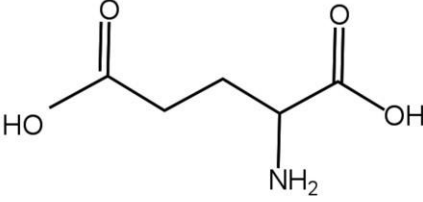
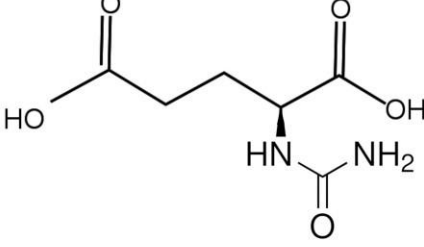
Substância	Fórmula estrutural
Ácido glutâmico	 <chem>NC(CC(=O)O)CC(=O)O</chem>
N-carbamil-L-ácido glutâmico	 <chem>NC(=O)N[C@@H](CC(=O)O)CC(=O)O</chem>

Figura 3. Fórmula estrutural dos aminoácidos ácido glutâmico e N-carbamil-L-ácido glutâmico. Fonte: Acervo pessoal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial do N-carbamil-L-ácido glutâmico na modulação da resposta alérgica mediada por IgE em modelo experimental, bem como investigar seu perfil toxicológico e inflamatório em células do sistema imunológico.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do N-carbamil-L-ácido glutâmico na linhagem celular de macrófagos RAW 264.7.
- Investigar o efeito do N-carbamil-L-ácido glutâmico sobre a produção da citocina TNF- α na linhagem celular de macrófagos RAW 264.7.
- Investigar o efeito do N-carbamil-L-ácido glutâmico sobre a produção da citocina IL-1 β na linhagem celular de macrófagos J774A.1.
- Avaliar a influência do N-carbamil-L-ácido glutâmico na produção e neutralização de óxido nítrico, bem como seu potencial antioxidante, em ensaios celulares utilizando a linhagem RAW 264.7.
- Estabelecer um modelo murino BALB/c de alergia mediada por IgE utilizando albumina 2S de *Ricinus communis*.
- Avaliar os níveis séricos de IL-4 e das imunoglobulinas IgE e IgG1 em camundongos sensibilizados, como confirmação da resposta alérgica.
- Investigar a capacidade do N-carbamil-L-ácido glutâmico em bloquear a resposta alérgica mediada por IgE *in vivo* por meio do teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA).
- Analisar alterações morfológicas associadas à ativação mastocitária após o tratamento com o N-carbamil-L-ácido glutâmico, por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do antígeno e preparo da solução experimental

3.1.1. Obtenção da albumina 2S da semente de mamona

A proteína albumina 2S de *Ricinus communis*, utilizada para a sensibilização dos camundongos, foi previamente purificada a partir de sementes de *Ricinus communis* L. no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPF/UENF). A obtenção da proteína seguiu os protocolos descritos por Thorpe et al. (1988), com adaptações propostas por Felix et al. (2008), conforme detalhado na tese de Débora Mothé de Campos Mesquita (2016). De forma resumida, o processo envolveu etapas de extração proteica, seguidas por cromatografia de exclusão molecular e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, permitindo a obtenção da fração correspondente às albuminas 2S com elevado grau de pureza.

Após a purificação, as frações contendo albumina 2S foram concentradas, liofilizadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização nos ensaios experimentais.

3.1.2. Preparo da solução de N-carbamil-L-ácido glutâmico

O composto N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu) foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich. A solução utilizada nos experimentos foi preparada por dissolução do composto em soro fisiológico, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 3 mg/mL. Após o preparo, a solução foi mantida sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de sua utilização nos ensaios experimentais.

3.2. Caracterização do perfil toxicológico e inflamatório do N-carbamil-L-ácido glutâmico em macrófagos

Esta etapa do estudo foi conduzida no Laboratório do Reconhecer (LBR) da UENF em colaboração com a Profª. Dra. Thatiana Lopes Biá Ventura Simão, a Dra. Yasmin Viana Martins e os alunos de Iniciação Científica Fábio Hugo Siqueira Ferreira e Júlia Costa de Souza.

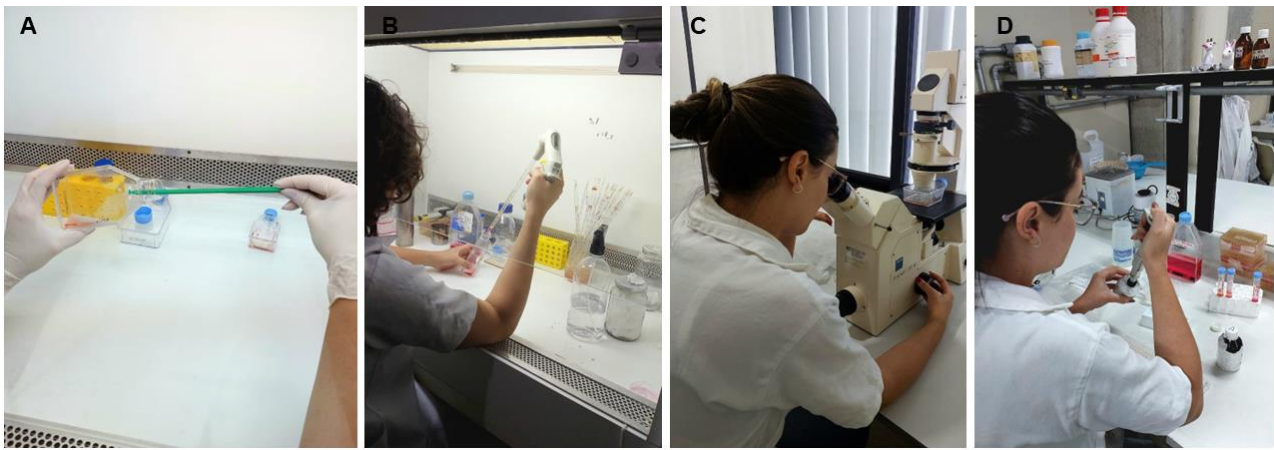


Figura 4. Etapas do protocolo experimental empregadas na caracterização do perfil toxicológico e inflamatório do N-carbamil-L-ácido glutâmico em macrófagos. As imagens ilustram o preparo das culturas celulares, a realização dos tratamentos e os procedimentos analíticos utilizados nos ensaios *in vitro*. Fonte: acervo pessoal.

3.2.1. Cultivo e tratamento celular

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas duas linhagens murinas de macrófagos, RAW 264.7 e J774A.1, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). A utilização de ambas as linhagens foi necessária devido às diferenças funcionais relacionadas à ativação do inflamassoma, uma vez que células RAW 264.7 não expressam o componente ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), essencial para a formação do complexo inflamassoma e para a geração da forma ativa da IL-1 β . Dessa forma, a linhagem J774A.1, que apresenta esse componente, foi utilizada para os ensaios envolvendo a produção de IL-1 β . As células foram mantidas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em estufa a 37 °C, sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Para os experimentos, ambas as culturas foram ajustadas para 5×10^5 células/mL, sendo plaqueado 100 uL por poço e distribuídas em placas de 96 poços contendo meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB, onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu) nas concentrações de 0,8; 4; 20; e 100 μ M, na presença ou ausência de LPS (1 μ g/mL; *E. coli* 055:B5). Após mais 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados para as análises subsequentes.

Nas culturas de RAW 264.7, foram avaliados viabilidade celular, produção de NO, TNF- α e capacidade antioxidante (DPPH). Os sobrenadantes obtidos dos cultivos de J774A.1 foram utilizados para determinação de IL-1 β .

3.2.2. Avaliação da citotoxicidade

A viabilidade celular dos macrófagos expostos ao N-Carb-Glu foi avaliada pelo método colorimétrico do 3-(4,5dimetiliazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol (MTT), conforme descrito por

Mosmann (1983). Esse ensaio se baseia na capacidade de células metabolicamente ativas de reduzir o sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio em cristais de formazan, cuja formação está diretamente associada à integridade e funcionalidade mitocondrial.

Após 24 horas de tratamento das células RAW 264.7, foram adicionados 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) a cada poço, e as placas foram incubadas por mais 2 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Ao término da incubação, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados foram solubilizados em solução de isopropanol acidificado com HCl (4 mM). A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas.

Para interpretação dos resultados, dois controles experimentais foram empregados de forma padronizada. O controle positivo de viabilidade correspondeu à cultura de macrófagos estimulados com LPS e não tratados com N-Carb-Glu, representando a condição de maior atividade metabólica esperada no ensaio. Já o controle negativo, utilizado como referência de morte celular, foi obtido mediante exposição das células ao Triton X-100 a 1%, garantindo a determinação do valor mínimo de viabilidade. As absorbâncias obtidas nas amostras tratadas foram comparadas a esses controles, permitindo o cálculo do percentual de citotoxicidade para cada concentração avaliada.

3.2.3. Quantificação de citocinas

A quantificação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β foi realizada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos após o período de incubação com N-Carb-Glu. Para essa análise, foram utilizados kits comerciais de ELISA do tipo sanduíche, adquiridos de acordo com a especificidade de cada citocina (BD Biosciences, CA, USA), seguindo rigorosamente as instruções fornecidas pelos fabricantes. A produção de TNF- α foi avaliada nos sobrenadantes provenientes das culturas de RAW 264.7, enquanto a quantificação de IL-1 β foi realizada nas amostras obtidas das culturas de J774A.1. As concentrações das citocinas foram expressas em pg/mL, determinadas a partir das curvas padrão geradas com citocinas murinas recombinantes.

As culturas estimuladas com LPS (1 µg/mL) e não tratadas foram utilizadas como controle positivo, representando a maior indução de citocinas. Já as culturas não estimuladas e não tratadas serviram como controle negativo, refletindo os níveis basais dos mediadores. A comparação com esses controles permitiu verificar se o N-Carb-Glu alterou a produção de TNF- α e IL-1 β pelas células.

3.2.4. Avaliação da produção de NO

A produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos tratados com N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu) foi estimada indiretamente pela quantificação de nitrito no sobrenadante das culturas de RAW 264.7, utilizando o ensaio de Griess, conforme descrito por Griess (1864). Após 24

horas de incubação com N-Carb-Glu (0,8; 4; 20 e 100 μM), foram coletados 50 μL do sobrenadante de cada poço, os quais foram misturados a 50 μL do reagente de Griess (p-aminobenzenossulfonamida 1% e diidrocloreto de naftilenodiamina 0,1%, Sigma-Aldrich) em ácido fosfórico 5%. A reação foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz, e a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas.

A concentração de nitrito foi determinada a partir de curva padrão de nitrito de sódio, corrigida pelo branco contendo apenas os reagentes. Para interpretação dos resultados, as amostras foram comparadas aos controles do ensaio: o controle negativo, formado por culturas não estimuladas com LPS, representou o nível basal de produção de NO; e o controle positivo, constituído de macrófagos estimulados com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e não tratados, indicou a resposta máxima esperada. A partir dessa comparação, foi possível determinar se o N-Carb-Glu modularia a produção de NO pelos macrófagos.

3.2.5. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do N-Carb-Glu foi avaliada pelo método do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), conforme descrito por Molyneux (2004). Esse ensaio fundamenta-se na capacidade de compostos antioxidantes reduzirem o DPPH, originalmente de coloração violeta, à sua forma reduzida, caracterizada por tonalidade amarelada. A diminuição da absorbância reflete, portanto, o potencial sequestrador de radicais livres da substância testada.

As soluções de N-Carb-Glu foram preparadas em metanol, nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100 μM . Em placa de 96 poços, 50 μL de cada solução foi misturado a 50 μL da solução metanólica de DPPH (0,1 mM; Sigma-Aldrich). As misturas foram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao término da incubação, a absorbância foi medida a 515 nm em leitor de microplacas.

A capacidade de sequestro do radical DPPH foi expressa como percentual de atividade antioxidante, calculada segundo a fórmula:

$$\% \text{ sequestro} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100.$$

No ensaio, foram utilizados dois controles experimentais: o controle negativo, constituído pela solução de DPPH sem a presença de N-Carb-Glu, representando a absorbância máxima do radical; e o controle positivo, composto por metanol puro, utilizado para verificação do comportamento do sistema e estabilidade do reagente. Como referência de atividade antioxidante conhecida, empregou-se o composto 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT), preparado nas mesmas condições experimentais,

para comparar o potencial antioxidante do N-Carb-Glu com o de um antioxidante validado.

3.3. Avaliação do bloqueio de IgE *in vivo*

3.3.1. Experimentação animal

Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados 17 camundongos BALB/c machos, com 6 a 8 semanas de idade, adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas, com temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração comercial e água filtrada *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os animais foram alojados em grupos de 4 a 5 por caixa, contendo maravalha esterilizada como forração. A troca da maravalha e a reposição de água foram realizadas regularmente, e a ração foi reabastecida conforme necessário.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas institucionais da UENF. O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UENF) sob número 617, autorizando a realização das sensibilizações, manipulações experimentais e coletas realizadas neste estudo (**Anexo 1**). A eutanásia, quando necessária, foi conduzida por inalação de isoflurano seguida de deslocamento cervical, conforme recomendação do CONCEA, assegurando perda rápida de consciência e minimização do sofrimento animal.

A escolha da linhagem BALB/c foi baseada em sua ampla utilização em modelos experimentais de alergia e na predominância de uma resposta imunológica do tipo Th2, caracterizada pela elevada produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 após sensibilização antigênica. Esse perfil é mais acentuado em BALB/c do que em camundongos C57BL/6, que apresentam respostas menos polarizadas para Th2 (GUEDERS et al., 2009). Assim, a linhagem BALB/c mostrou-se particularmente adequada aos objetivos deste estudo, voltados à investigação de mecanismos associados à resposta alérgica.

3.3.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, conforme apresentado na Tabela 1, com o objetivo de avaliar a resposta imunológica induzida pela sensibilização com albumina 2S de mamona, bem como os efeitos moduladores do N-Carb-Glu quando administrado em diferentes momentos em relação ao teste cutâneo.

Tabela 1. Delineamento dos grupos experimentais.

Grupo	Descrição	Tratamento com N-Carb-Glu
G1	Controle — Sensibilização com solução salina	Não administrado
G2	Sensibilização com albumina 2S de mamona	Não administrado
G3		30 minutos antes do teste cutâneo
G4		Após o teste cutâneo
G5		Reforço 24 horas e depois 30 minutos antes do teste cutâneo

3.3.3. Protocolo de sensibilização

Os camundongos da linhagem BALB/c foram submetidos a um protocolo de sensibilização intraperitoneal com duração de 28 dias, baseado no esquema descrito por Chen et al. (2013), posteriormente avaliado por Arámburo-Gálvez et al. (2018), com adaptações no cronograma e/ou nas doses administradas. Cada animal recebeu 250 μ L de uma solução contendo 0,05 mg/mL de albumina 2S de mamona, administrada nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 (Figura 5).

A coleta de sangue foi realizada em três momentos distintos. No dia 0 (soro pré-sensibilização) e no dia 28 (soro pós-sensibilização), o sangue foi obtido por plexo retro-orbital, mediante aplicação prévia de colírio anestésico. No dia 30, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos ao teste cutâneo. Em seguida, foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca para obtenção do soro pós-tratamento e, posteriormente, a coleta das patas destinadas às análises microscópicas. Os soros obtidos em cada coleta foram

separados por centrifugação a $1500 \times g$ por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises imunológicas.

As etapas do protocolo de sensibilização e coleta de sangue estão ilustradas na **Figura 5**.



Figura 5. Cronograma do protocolo experimental de imunização. As setas representam as imunizações, e os asteriscos as coletas de sangue.

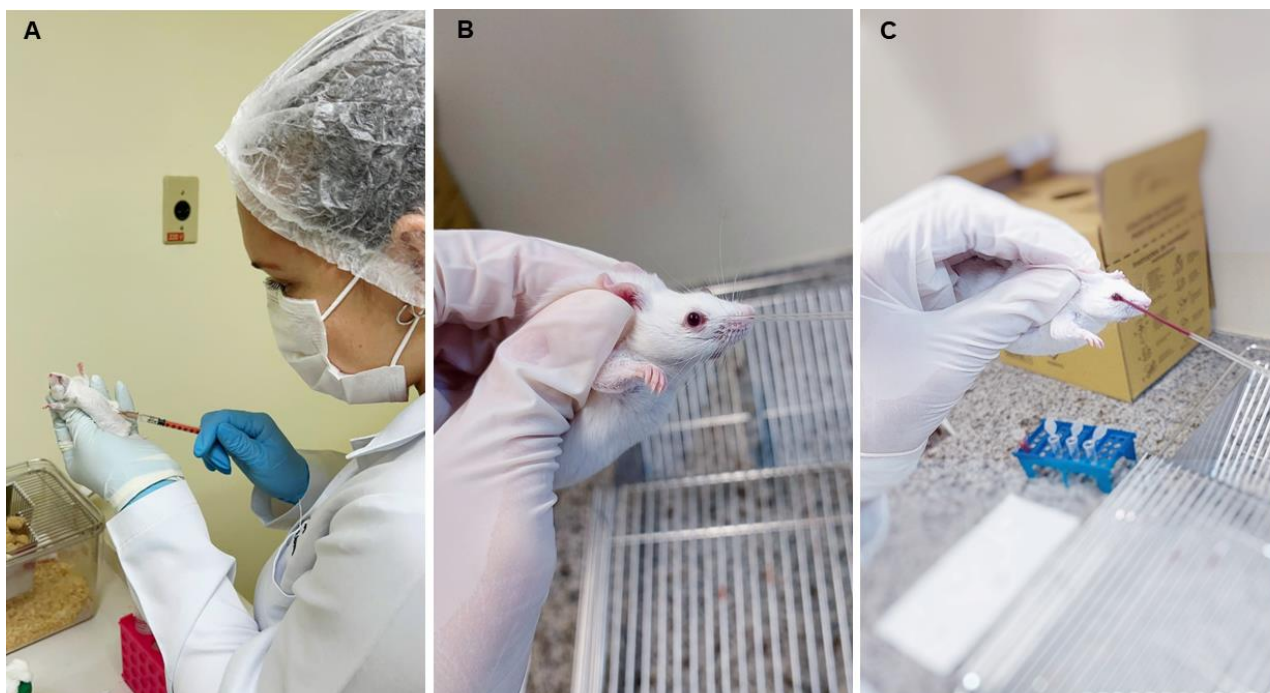


Figura 6. Representação fotográfica das etapas do protocolo de sensibilização e coleta de sangue em camundongos. (A) Administração do estímulo durante o protocolo de sensibilização; (B) contenção do animal para realização da coleta; (C) coleta de sangue para obtenção de soro. Fonte: acervo pessoal.

3.3.4. Detecção de imunoglobulinas IgE e IgG 1

Para a detecção de imunoglobulinas, foram utilizados kits ELISA murino para IgE e IgG 1. Nesse ensaio, placas de 96 poços de poliestireno foram revestidas com 60 μ L por poço de albumina 2S purificada (1 μ g/ μ L em tampão de carbonato de sódio-bicarbonato de sódio 50 mM, pH 9,6) a 4°C durante o período noturno. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo 1% de gelatina por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com PBS-T. As amostras de soro foram diluídas em PBS-T com 0,1% de gelatina e foram incubadas a 37°C por uma hora, nas proporções de 1:5 para IgE e 1:500 para IgG1. Após essa etapa, os poços foram lavados com PBS-T e tratados com anticorpos anti-IgE, anti-IgG e anti-IgG1 de camundongos, conjugados com peroxidase e diluídos em PBS-T com 0,1% de gelatina por uma hora a 37°C. Após isso, foi adicionada uma solução de substrato de o-fenilenodiamina peroxidase (OPD) para desenvolvimento da cor durante 15 minutos. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 3M, e a intensidade da cor foi medida por absorbância a 492 nm, utilizando um leitor de microplacas.

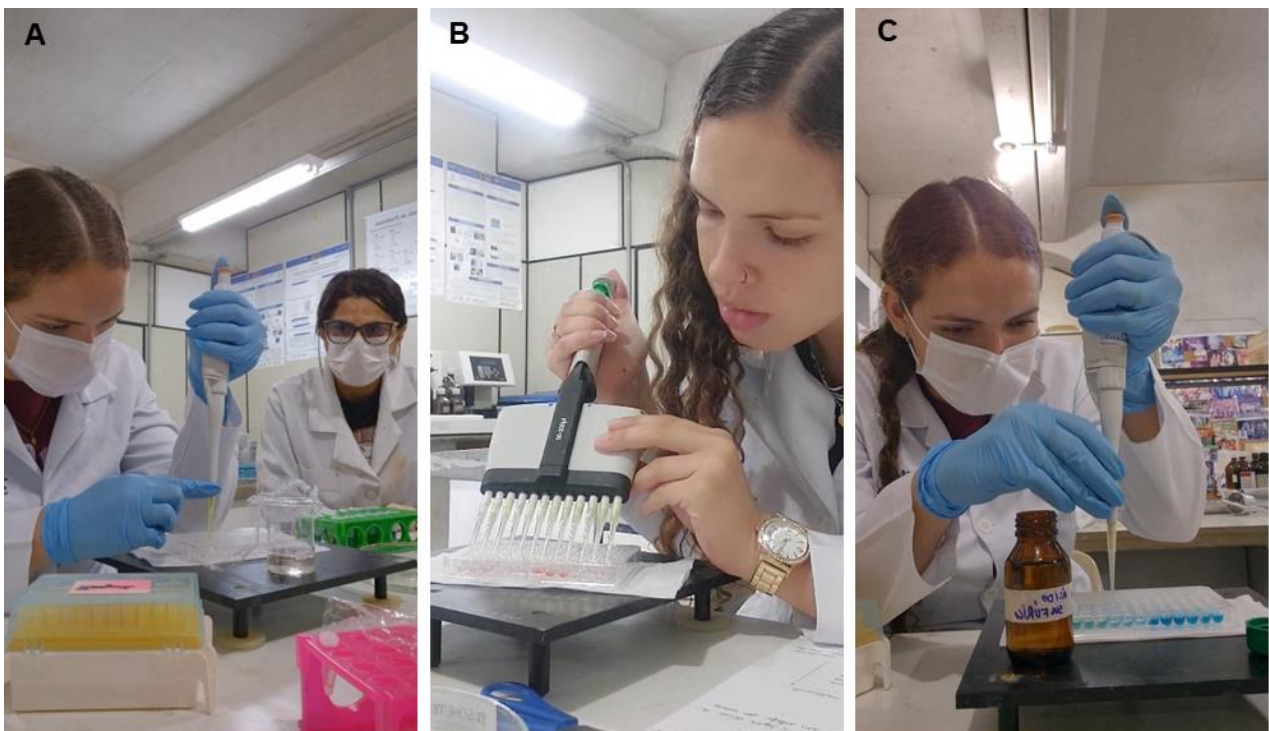


Figura 7. Registro fotografico das etapas do ensaio ELISA utilizado para a detecção de IgE e IgG1 em amostras de soro. As imagens ilustram o preparo das placas, a adição das amostras e reagentes, e os procedimentos de pipetagem durante o ensaio. Fonte: acervo pessoal.

3.3.5. Dosagem de IL-4 por ELISA

A concentração de IL-4 foi determinada no soro dos camundongos, coletado nos períodos pré-sensibilização e pós-sensibilização, por meio de ensaio ELISA do tipo sanduíche, utilizando o kit Mouse IL-4 ELISA Set (BD OptEIA™; BD Biosciences), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante.

As placas de 96 poços foram revestidas com o anticorpo de captura diluído em tampão apropriado (100 µL/poço) e incubadas overnight a 4 °C. Após lavagens com tampão de lavagem, foi realizada a etapa de bloqueio com diluente de ensaio por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço dos padrões e das amostras de soro, previamente diluídos no diluente de ensaio, e a placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente.

Após novas lavagens, foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado, seguido do conjugado estreptavidina-HRP, conforme recomendado pelo fabricante, com incubação por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, após nova etapa de lavagem, foi adicionada a solução de substrato TMB (100 µL/poço), mantendo-se a reação por 30 minutos, na ausência de luz. A reação foi interrompida com solução de parada e a leitura da absorbância foi realizada a 450 nm, com correção em 570 nm, quando aplicável.

As concentrações de IL-4 foram calculadas a partir de uma curva padrão, construída com IL-4 murina recombinante, e os resultados expressos em pg/mL

3.3.6. Teste cutâneo para Avaliação do Bloqueio de IgE (PCA)

Esse ensaio foi desenvolvido no Laboratório do Reconhecer (LBR/UENF), em colaboração com o Dr. Fabrício Moreira Almeida.

O teste cutâneo realizado foi utilizado para avaliar a resposta alérgica imediata mediada por IgE em modelo experimental. O ensaio baseia-se no aumento da permeabilidade vascular após o desafio antigênico em animais previamente sensibilizados, resultando no extravasamento de proteínas plasmáticas e do corante azul de Evans, permitindo a avaliação da ativação mastocitária e da resposta inflamatória local. O protocolo experimental adotado foi baseado na metodologia descrita por Smaldini et al. (2015), com adaptações. No presente estudo, o PCA foi empregado como ferramenta para avaliar a resposta alérgica imediata induzida pela albumina 2S de mamona e investigar o potencial efeito modulador do N-Carb-Glu sobre eventos associados à ativação mastocitária e ao extravasamento vascular.

No dia 30 do protocolo experimental, os camundongos foram submetidos ao teste cutâneo. Conforme o delineamento experimental, os animais do Grupo 3 receberam 200 µL de N-Carb-Glu 30 mg/kg por via intraperitoneal 30 minutos antes da realização do teste, enquanto os demais grupos não receberam tratamento nesse momento. Em seguida, todos os animais foram submetidos à injeção

intradérmica de 20 μ L contendo 50 μ g de albumina 2S de mamona na pata direita, enquanto a pata contralateral recebeu 20 μ L de solução salina, utilizada como controle interno. Após a realização do teste cutâneo, os animais do Grupo 4 receberam 200 μ L de N-Carb-Glu 30 mg/kg por via intraperitoneal, para posterior análise dos teores de interleucinas.

Na sequência, foi administrado corante azul de Evans a 0,1% (100 μ L) por via intravenosa em todos os grupos. A resposta alérgica foi avaliada por meio da observação do extravasamento do corante azul de Evans, indicativo de aumento da permeabilidade vascular, bem como pela mensuração do edema das patas, permitindo a comparação entre os grupos experimentais.

O procedimento experimental do teste cutâneo está ilustrado na **Figura 8**.

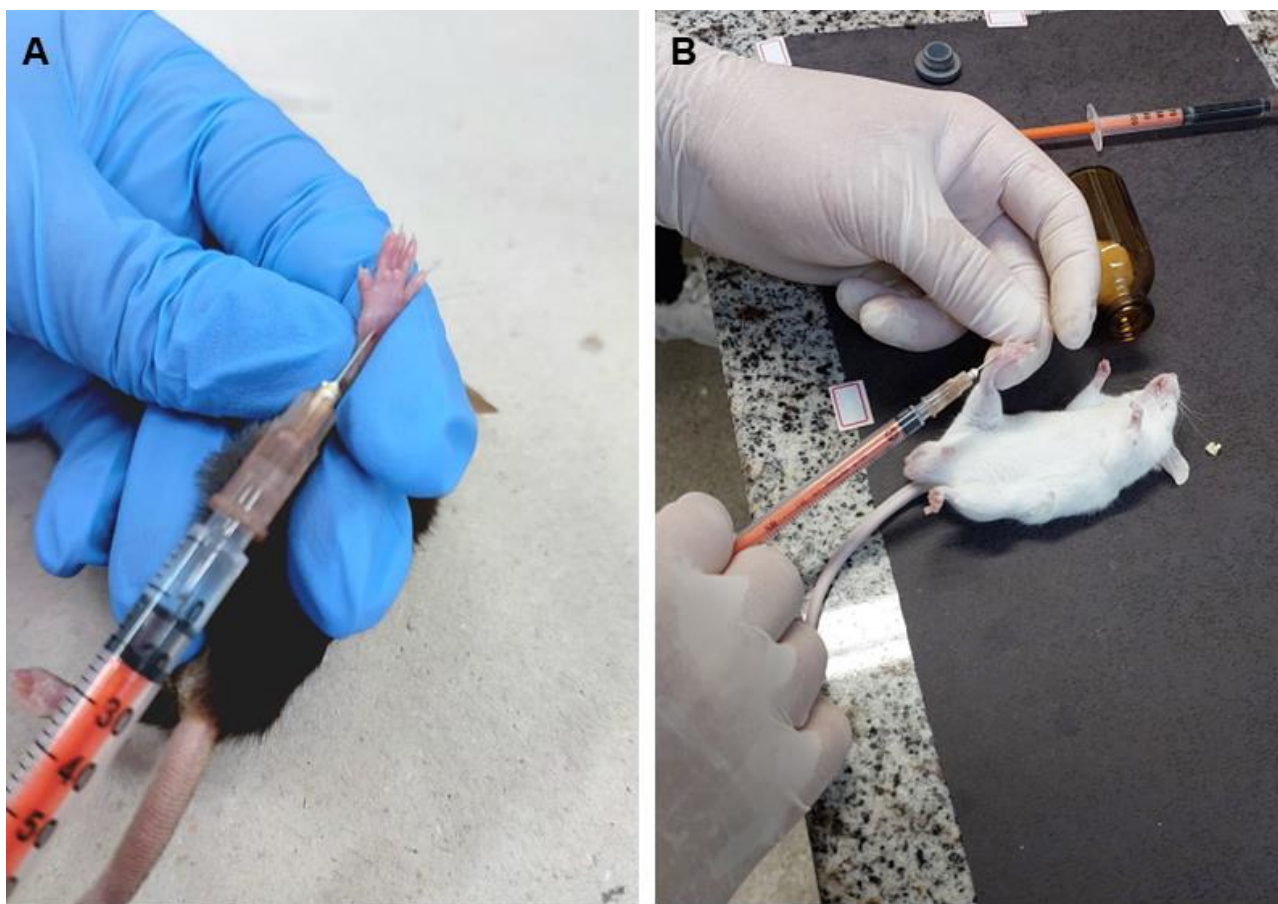


Figura 8. Ilustração do procedimento do teste cutâneo utilizado neste estudo. (A) Aplicação do estímulo na região plantar da pata; (B) realização do teste cutâneo para avaliação da resposta imediata. Fonte: acervo pessoal.

3.3.7. Registro fotográfico da resposta cutânea imediata

Após 15 minutos da administração intravenosa do corante azul de Evans, as patas traseiras dos camundongos foram fotografadas individualmente sob condições padronizadas de iluminação, distância e foco, a fim de garantir uniformidade na aquisição das imagens. As fotografias obtidas

foram utilizadas para a avaliação qualitativa da resposta vascular, considerando a extensão da área de extravasamento, a intensidade da coloração azul, bem como a diferença entre as patas direita e esquerda e a comparação entre os grupos experimentais. Essa etapa permitiu o registro visual do grau de anafilaxia cutânea induzida pelo alérgeno, assim como a análise do possível efeito modulador dos tratamentos administrados.

3.3.8. Coleta e processamento das patas

Ao término da avaliação macroscópica da resposta cutânea, os animais foram submetidos à coleta das patas traseiras direita e esquerda. As amostras foram cuidadosamente seccionadas de modo a preservar a região correspondente ao local da injeção intradérmica, garantindo a integridade da área de interesse para as análises subsequentes.

Para fins de avaliação morfológica, os animais de cada grupo experimental foram divididos, de modo que as amostras obtidas fossem destinadas às análises por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme os protocolos específicos descritos a seguir.

3.3.9. Processamento histológico para microscopia óptica

Essa etapa foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho e a residente de Patologia Animal Bruna Barreto Victorino Costa do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) da UENF.

As amostras das patas destinadas à análise histológica foram inicialmente fixadas em solução de formol neutro tamponado a 10%, visando à adequada preservação das estruturas teciduais. Após a fixação, os fragmentos foram submetidos à descalcificação em solução de ácido nítrico a 7%, permanecendo imersos por 48 horas, procedimento necessário para a remoção dos componentes minerais do tecido ósseo da pata e para facilitar o corte histológico e o posterior emblocamento.

Após a etapa de descalcificação, as amostras foram submetidas ao processamento histológico, que compreendeu a desidratação em séries crescentes de etanol, seguida de diafanização em xilol e posterior inclusão em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo, gerando cortes histológicos com espessura aproximada de 5 µm, os quais foram montados em lâminas de vidro.

Para a identificação de mastócitos, os cortes histológicos foram submetidos à coloração com azul de toluidina, técnica que permite a visualização dessas células em razão da metacromasia característica de seus grânulos citoplasmáticos. As lâminas coradas foram analisadas em microscópio óptico, possibilitando a avaliação da presença, distribuição e morfologia dos mastócitos, bem como de alterações histológicas associadas à resposta inflamatória cutânea na região correspondente ao

local da injeção intradérmica.



Figura 9. Registro visual das etapas do processamento histológico para análise por microscopia óptica. (A) Preparo do material biológico; (B) processamento e montagem das lâminas histológicas; (C) análise das lâminas em microscopia óptica. Fonte: acervo pessoal.

3.3.10. Processamento dos tecidos para microscopia eletrônica de transmissão

Essa etapa foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra e a MSc. Amanda Mello da Silva Oliveira do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da UENF.

As amostras destinadas à microscopia eletrônica de transmissão foram inicialmente lavadas duas vezes em tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, realizou-se à fixação primária em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído recém-preparado, diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,0), por 1 hora à temperatura ambiente.

Após a fixação primária, as amostras foram submetidas à pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 40 minutos, seguida de desidratação em série crescente de acetona (20%, 40%, 60%, 80% e 100%). Posteriormente, o material foi infiltrado e incluído em resina Epon, sendo então submetido ao processo de polimerização.

Após a polimerização da resina, seções ultrafinas foram obtidas com o auxílio de um ultramicrotomo e contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 3%. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1400 Plus.

3.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. One-way ANOVA e o teste de Tukey foram utilizados para avaliar os efeitos de um único parâmetro. Os valores de CC50, IC50 e MIC foram calculados por meio de análise de regressão não linear do log [concentração]/curvas de inibição de três experimentos diferentes, usando o GraphPad Prism 8.

4. RESULTADOS

Neste trabalho são apresentados os resultados obtidos a partir dos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados para avaliar o potencial do N-Carb-Glu como modulador da resposta alérgica mediada por IgE. Inicialmente, são apresentados os resultados referentes à caracterização do perfil toxicológico, inflamatório e antioxidante do composto em macrófagos murinos. Em seguida, são descritos os resultados dos ensaios *in vivo*, incluindo a avaliação da resposta humoral induzida pela sensibilização com albumina 2S de mamona, avaliada por meio da detecção de IgE, IgG1 e IL-4 no soro dos camundongos, e o bloqueio funcional da IgE por meio do teste cutâneo de anafilaxia passiva, bem como as análises morfológicas associadas.

4.1. Caracterização do perfil toxicológico e inflamatório do N-Carb-Glu em macrófagos

4.1.1. Avaliação da citotoxicidade do N-Carb-Glu em macrófagos RAW 264.7

A viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 foi avaliada pelo ensaio de MTT após 24 horas de estímulo com LPS e tratamento com N-Carb-Glu nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100 μM . Conforme apresentado na **Figura 10**, as concentrações de 0,8 e 4 μM não apresentaram diferença em relação ao controle positivo (células estimuladas e não tratadas).

Nas concentrações de 20 e 100 μM , observou-se redução da viabilidade celular em comparação ao controle positivo, com diferença estatisticamente significativa (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, respectivamente). Apesar disso, na concentração de 100 μM a viabilidade celular manteve-se em aproximadamente 80%. O controle negativo (Triton X-100) apresentou redução acentuada da viabilidade, confirmando a adequação do ensaio. Os dados são apresentados como média \pm desvio

padrão.

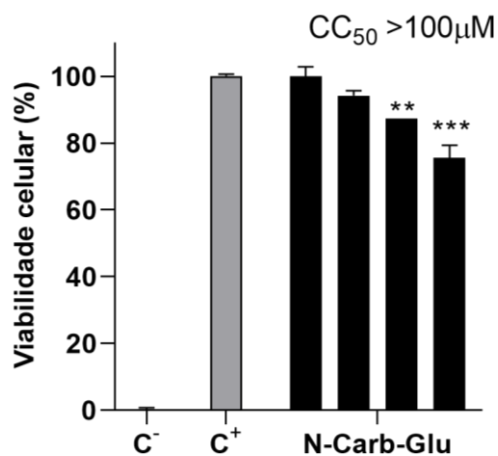


Figura 10. Efeito do N-Carb-Glu na viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados por LPS (1 µg/mL) e tratados com N-Carb-Glu nas concentrações de 0.8 , 4, 20 e 100 µM por 24 h. Após este período a viabilidade da cultura foi avaliada através do método de MTT. Como controle negativo foi utilizado macrófagos estimulados e tratados com Triton X-100 enquanto para o controle positivo foi utilizado a cultura de macrófagos estimulada e não tratada. As barras estão em ordem crescente de concentração. Os valores foram representados como média ± desvio padrão, onde grupos diferentes do controle positivo (C+) foram considerados significantes segundo $p < 0,05$ (), $p < 0,01$ () e $p < 0,001$ (**).

4.1.2. Efeito do N-Carb-Glu sobre a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7

A produção de óxido nítrico foi avaliada em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e tratados com N-Carb-Glu nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100 µM, por meio da quantificação de nitrito no sobrenadante das culturas. Conforme apresentado na **Figura 11**, o estímulo com LPS promoveu aumento da produção de NO em comparação ao controle negativo não estimulado.

O tratamento com N-Carb-Glu, nas concentrações avaliadas, apresentou valores de NO semelhantes aos do controle positivo (LPS), não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o controle positivo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

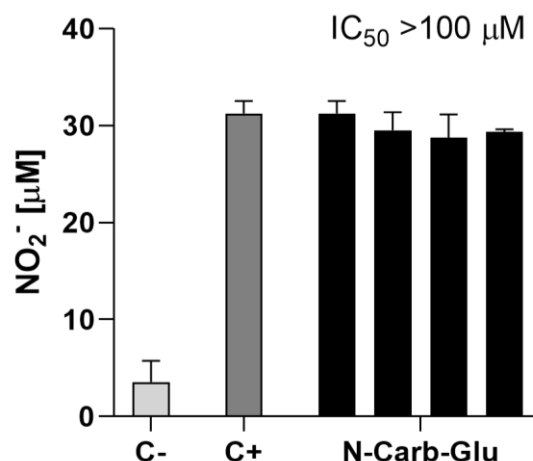


Figura 11. Efeito do N-Carb-Glu na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados por LPS (1 µg/mL) e tratados com N-Carb-Glu nas concentrações de 0.8 , 4, 20 e 100 µM por 24 h. Após este período o sobrenadante da cultura foi avaliado quanto a presença de NO através do ensaio de Griess. Como controle negativo foi utilizado macrófagos não estimulados e não tratados enquanto para o controle positivo foi utilizado a cultura de macrófagos estimulada e não tratada. As barras estão em ordem crescente de concentração. Os valores foram representados como média ± desvio padrão, onde grupos diferentes do controle positivo (C+) foram considerados significantes segundo $p < 0,05$ (), $p < 0,01$ () e $p < 0,001$ (**).

4.1.3. Modulação da produção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 tratados com N-Carb-Glu

A produção da citocina pró-inflamatória TNF- α foi avaliada em macrófagos RAW 264.7 estimulados e tratados com N-Carb-Glu nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100 µM. Conforme demonstrado na Figura 12, o tratamento com o composto resultou em redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- α em todas as concentrações avaliadas, quando comparadas ao controle positivo.

Observou-se que a diminuição da produção de TNF- α ocorreu de maneira dependente da concentração, sendo mais evidente nas concentrações de 20 e 100 µM. Nas concentrações de 0,8 e 4 µM, embora a redução tenha sido significativa em relação ao controle positivo, o efeito apresentou menor magnitude quando comparado às concentrações mais elevadas. Esses resultados indicam que o N-Carb-Glu é capaz de modular a produção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 de forma dependente da concentração.

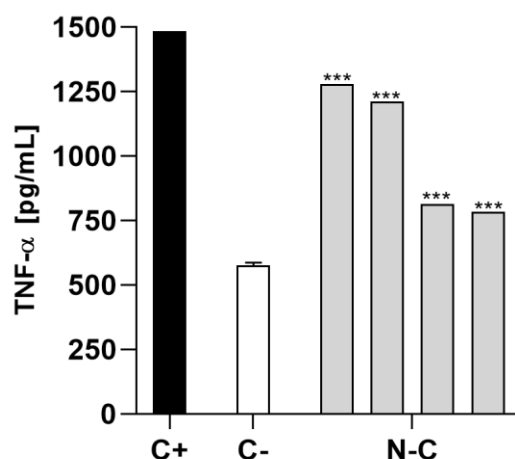


Figura 12. Efeito do N-carbamil-L-ácido glutâmico na produção de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS (1 μ g/mL) na presença de N-carbamil-L-ácido glutâmico (0,8, 4, 20 e 100 μ M) durante 24h. Os sobrenadantes da cultura foram coletados e avaliados por ELISA sanduíche. Como controle negativo foi utilizado o sobrenadante da cultura de macrófagos sem estímulo e como controle positivo, sobrenadante da cultura de macrófagos estimulado sem tratamento. Valores foram reportados como média \pm desvio padrão e considerados diferentes em relação ao controle positivo de acordo com $p < 0,001$ (***).

Adicionalmente, a partir da curva concentração–resposta, foi determinada a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) do N-Carb-Glu sobre a produção de TNF- α . O composto apresentou IC₅₀ de $8,2 \pm 2,5$ μ M, conforme apresentado na Tabela 2, indicando que a modulação desse mediador inflamatório ocorre em concentrações relativamente baixas dentro do intervalo testado, corroborando os efeitos observados no ensaio de modulação dessa citocina.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (50%) de N-carbamil-L-ácido glutâmico na inibição da produção da citocina TNF- α em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

Amostras	IC50 TNF- α (μ M)
N-carb-glu	$8,2 \pm 2,5$
IBUP ¹	$2,1 \pm 0,8$

¹IBUP – AINE. Valores reportados como média \pm desvio padrão.

4.1.4. Efeito do N-Carb-Glu sobre a produção de IL-1 β em macrófagos J774A.1

A produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β foi avaliada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e tratados com N-Carb-Glu nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100 μ M, por meio de ensaio ELISA sanduíche. Conforme apresentado na **Figura 13**, o estímulo com LPS promoveu aumento expressivo da produção de IL-1 β em comparação ao controle negativo não estimulado.

O tratamento com N-Carb-Glu resultou em redução significativa da produção de IL-1 β em relação ao controle positivo estimulado apenas com LPS, em todas as concentrações avaliadas. Observa-se que os níveis de IL-1 β nos grupos tratados foram substancialmente inferiores aos do controle positivo. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, e as diferenças estatísticas em relação ao controle positivo estão indicadas na **figura 13**.

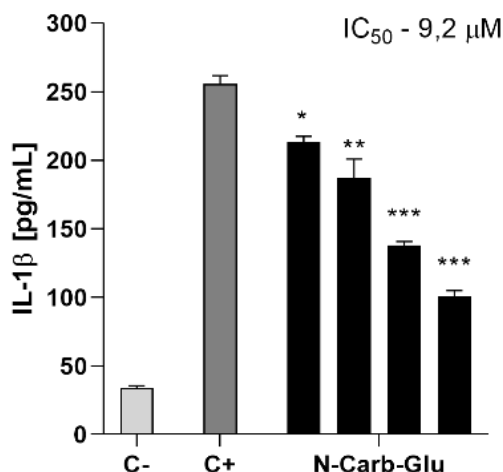


Figura 13. Efeito do N-Carb-Glu em inibir a produção de IL-1 β em macrófagos murinos J774A.1. Macrófagos foram estimulados por LPS e posteriormente tratados na presença de N-Carb-Glu (0.8, 4, 20 e 100 μ M) durante 24 h. Os sobrenadantes da cultura celular foram coletados e avaliados quanto a produção de IL-1 β através do método de ELISA sanduíche. O controle negativo de produção de IL-1 β foi estabelecido como a cultura de macrófagos não estimulada e não tratada (C-) enquanto para o controle positivo (C+), foi obtido através do estímulo da cultura de macrófagos por LPS na concentração de 1 mg/mL. Os valores foram reportados como média \pm desvio padrão, e grupos diferentes do C+ foram considerados significantes de acordo com $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

4.1.5. Avaliação da atividade antioxidante do N-Carb-Glu pelo método do DPPH

A atividade antioxidante do N-Carb-Glu foi avaliada pelo método do radical estável DPPH, por meio da determinação do percentual de sequestro do radical após 1 hora de incubação. Conforme apresentado na **Figura 14**, o N-Carb-Glu apresentou baixo potencial de sequestro do radical livre nas concentrações avaliadas.

O valor de IC₅₀ determinado para o N-Carb-Glu foi superior a 100 μ M. Em comparação ao composto de referência BHT, utilizado como antioxidante, o N-Carb-Glu apresentou valores inferiores de atividade antioxidante. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

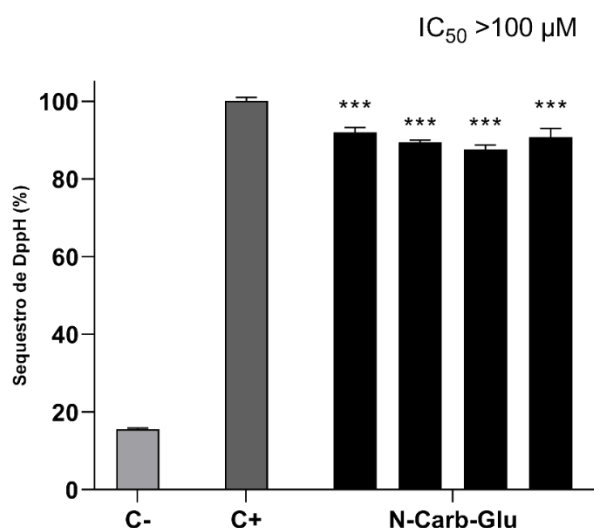


Figura 14. Avaliação da atividade antioxidante do N-Carb-Glu frente ao radical livre DPPH. O N-Carb-Glu, nas concentrações de 0,8, 4, 20 e 100 μM , foi exposto à solução de DPPH por 1h. Após este período, o sequestro do radical foi verificado através de leitura por espectrofotômetro. Como controle positivo do sequestro de DPPH foi utilizado metanol puro e como controle negativo foi utilizada somente a solução de DPPH. As barras estão em ordem crescente de concentração. Valores reportados como média \pm desvio padrão e considerados diferentes em relação ao controle positivo de acordo com $p < 0,001$ (***).

4.2. Avaliação da resposta humoral induzida pela sensibilização com albumina 2S de mamona

4.2.1. Detecção de IgE específica no soro de camundongos sensibilizados

A produção de IgE específica anti-albumina 2S foi avaliada no soro de camundongos BALB/c antes e após o protocolo de sensibilização, por meio de ensaio ELISA. Conforme apresentado na **Figura 15**, observou-se aumento dos níveis séricos de IgE específica no soro pós-sensibilização quando comparado ao soro pré-sensibilização.

No período pré-sensibilização, os níveis de IgE específica foram baixos, enquanto após a sensibilização com albumina 2S de mamona houve elevação desses níveis. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média, e as diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas na figura.

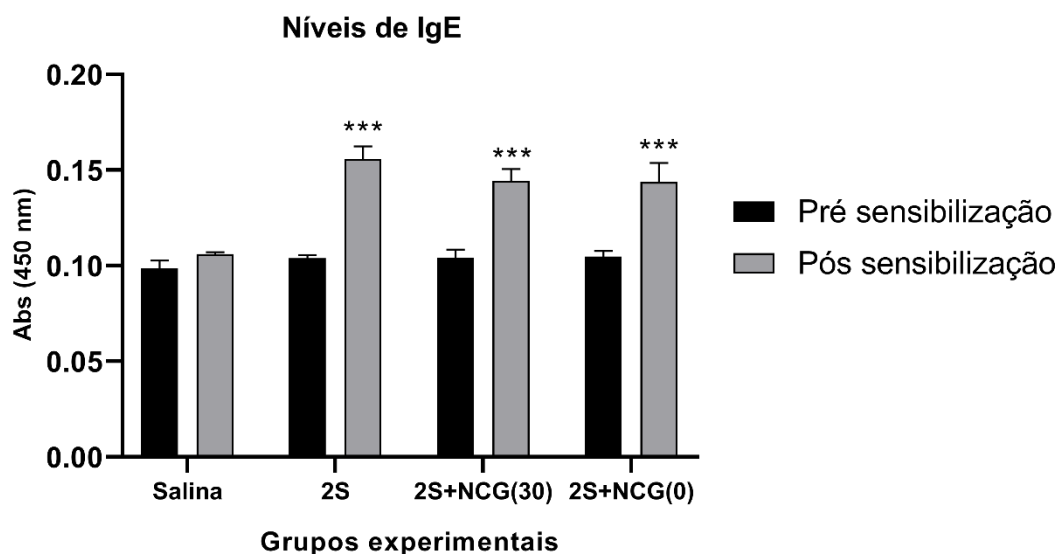


Figura 15. Detecção de IgE específica anti-albumina 2S no soro de camundongos BALB/c antes (pré-sensibilização) e após (pós-sensibilização) o protocolo experimental. A IgE específica foi quantificada por ELISA nos grupos salina (controle), Albumina 2S (2S), 2S+ NCG(30) e 2S+NCG(0). As barras pretas representam os valores obtidos no soro pré-sensibilização, enquanto as barras cinzas correspondem ao soro pós-sensibilização. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4.2.2. Detecção de IgG1 específica no soro de camundongos sensibilizados

A produção de IgG1 específica anti-albumina 2S foi avaliada no soro de camundongos BALB/c antes e após o protocolo de sensibilização, por meio de ensaio ELISA. Conforme apresentado na **Figura 16**, observou-se aumento dos níveis séricos de IgG1 específica no soro pós-sensibilização quando comparado ao soro pré-sensibilização.

No período pré-sensibilização, os níveis de IgG1 específica foram baixos, enquanto após a sensibilização com albumina 2S de mamona houve elevação desses níveis. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média, e as diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas na figura.

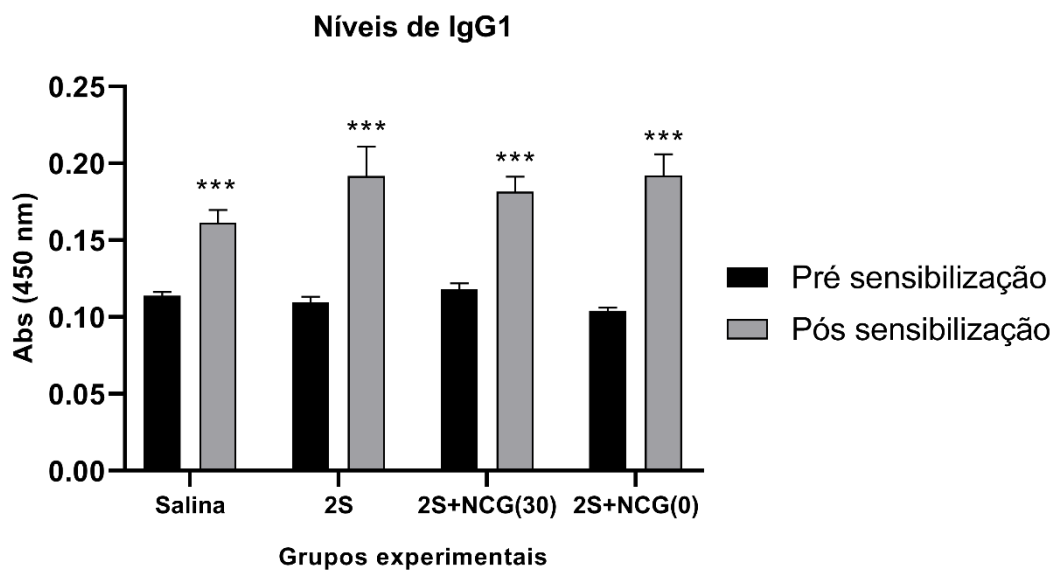


Figura 16. Detecção de IgG1 específica anti-albumina 2S no soro de camundongos BALB/c antes (pré-sensibilização) e após (pós-sensibilização) o protocolo experimental. A IgG1 específica foi quantificada por ELISA nos grupos salina (controle), Albumina 2S (2S), 2S+ NCG(30) e 2S+NCG(0). As barras pretas representam os valores obtidos no soro pré-sensibilização, enquanto as barras cinzas correspondem ao soro pós-sensibilização. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4.2.3. Avaliação da produção sistêmica de IL-4 após sensibilização com albumina 2S

A concentração sérica de IL-4 foi avaliada em camundongos BALB/c antes e após o protocolo de sensibilização, por meio de ensaio ELISA. Conforme apresentado na **Figura 17**, observou-se aumento da concentração sérica de IL-4 no período pós-sensibilização quando comparado ao período pré-sensibilização.

No soro pré-sensibilização, os níveis de IL-4 foram baixos, enquanto após a sensibilização com albumina 2S de mamona houve elevação evidente dessa citocina. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média, e as diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas na **figura 17**.

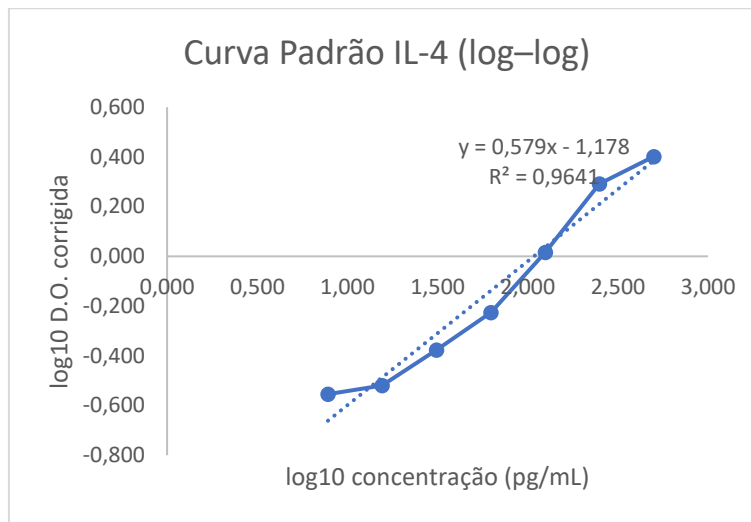


Gráfico 1. Curva padrão de IL-4

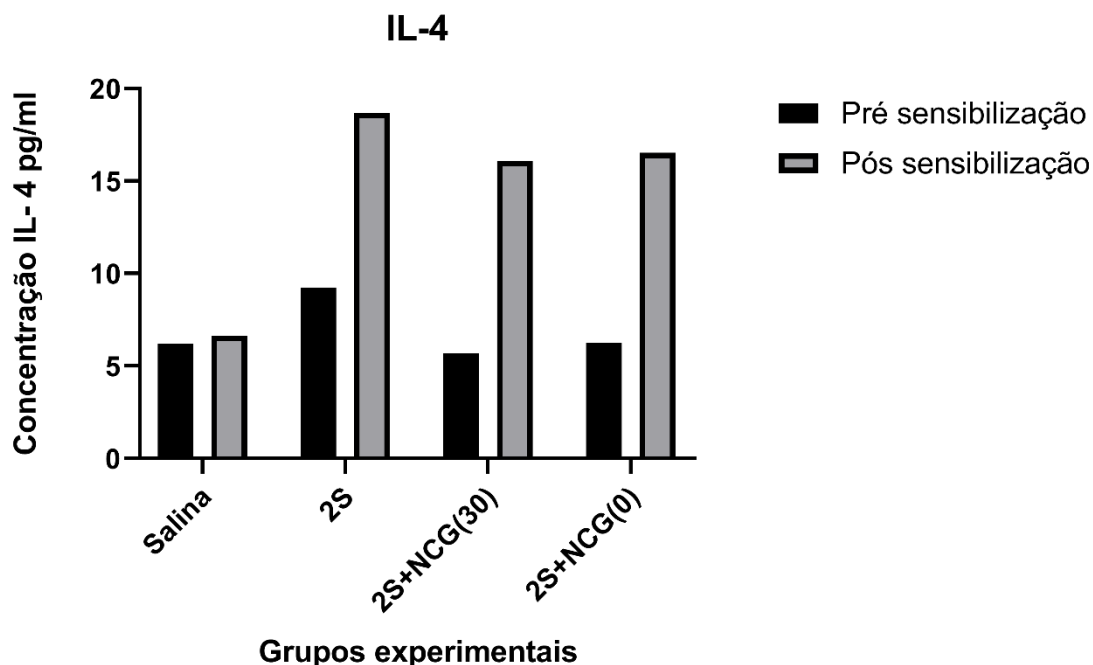


Figura 17. Concentração sérica de IL-4 em camundongos BALB/c antes (pré-sensibilização) e após (pós-sensibilização) o protocolo experimental. Os níveis de IL-4 foram determinados por ELISA em amostras de soro dos grupos salina (controle), 2S, 2S+NCG(30) 2S+NCG(0). As barras pretas representam os valores obtidos no soro pré-sensibilização, enquanto as barras cinzas correspondem ao soro pós-sensibilização.

4.3. Avaliação do bloqueio de IgE *in vivo* pelo teste cutâneo (PCA)

4.3.1. Resposta cutânea imediata induzida pela albumina 2S de mamona

A resposta cutânea imediata foi avaliada por meio do teste de anafilaxia cutânea passiva, utilizando o extravasamento do corante Azul de Evans como indicador de aumento da permeabilidade vascular. Conforme apresentado na **Figura 18**, os animais do grupo controle (G1) não apresentaram extravasamento visível do corante na região plantar após o desafio cutâneo.

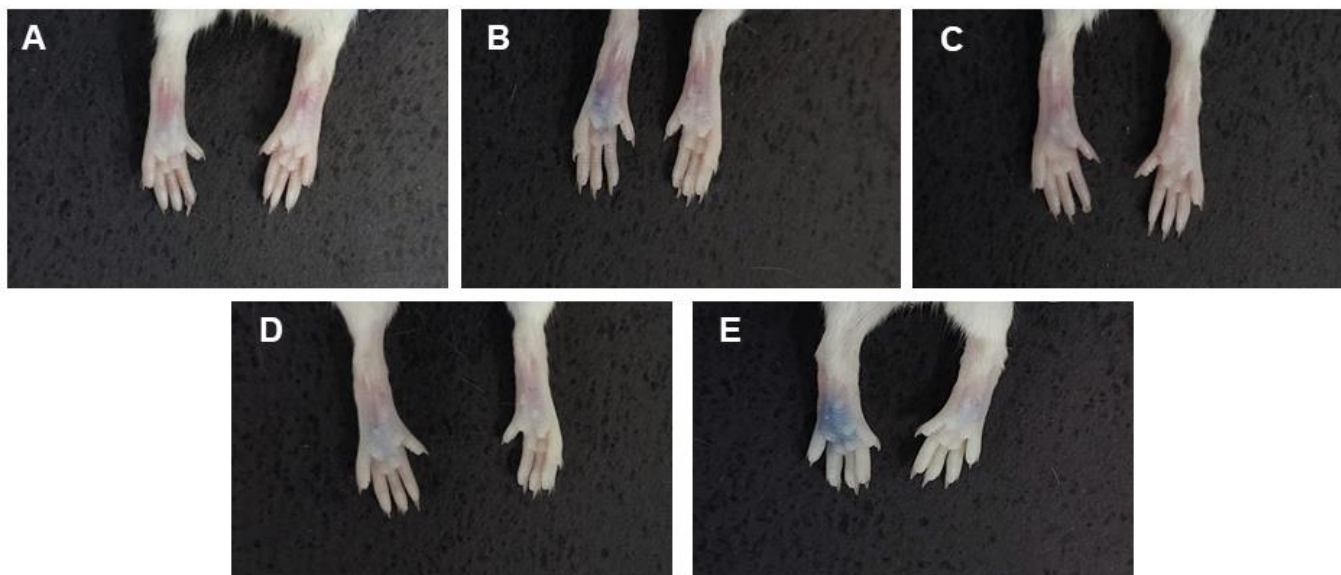
Em contraste, os animais que foram sensibilizados e não receberam tratamento (G2)

apresentaram extravasamento intenso do Azul de Evans, caracterizado por coloração azulada evidente nas patas, indicando resposta cutânea imediata.

Os animais tratados com N-Carb-Glu 30 minutos antes do desafio cutâneo (G3) apresentaram redução visível do extravasamento do corante quando comparados ao grupo sensibilizado sem tratamento. Redução semelhante foi observada nos animais tratados com N-Carb-Glu 24 horas e 30 minutos antes do desafio (G5).

Por outro lado, os animais tratados com N-Carb-Glu após a realização do teste cutâneo (G4) apresentaram extravasamento do corante semelhante ao observado no grupo sensibilizado sem tratamento.

Figura 18. Fotografias representativas das patas de camundongos após o teste cutâneo com albumina 2S de mamona. As imagens ilustram a resposta inflamatória macroscópica observada nos diferentes grupos experimentais após o desafio cutâneo. (A) G1, controle; (B) G2, sensibilizado sem tratamento; (C) G3, tratado



30 min antes; (D) G5, tratado 24h + 30 min antes; (E) G4, tratado após o teste cutâneo.

4.4. Avaliação morfológica da resposta cutânea

4.4.1. Análise histológica das patas por microscopia óptica

A análise histológica das patas foi realizada por microscopia óptica com o objetivo de avaliar as alterações teciduais associadas à resposta cutânea imediata. Conforme apresentado na **Figura 19**, as amostras do grupo controle (G1) apresentaram organização tecidual preservada, com presença discreta de mastócitos íntegra (Figura 19-A).

Nos animais sensibilizados sem tratamento (G2), observou-se maior densidade de mastócitos na região analisada, os quais apresentaram mastócitos desgranulados, caracterizada por contornos celulares irregulares e dispersão do conteúdo citoplasmático no tecido adjacente (Figura 19-B).

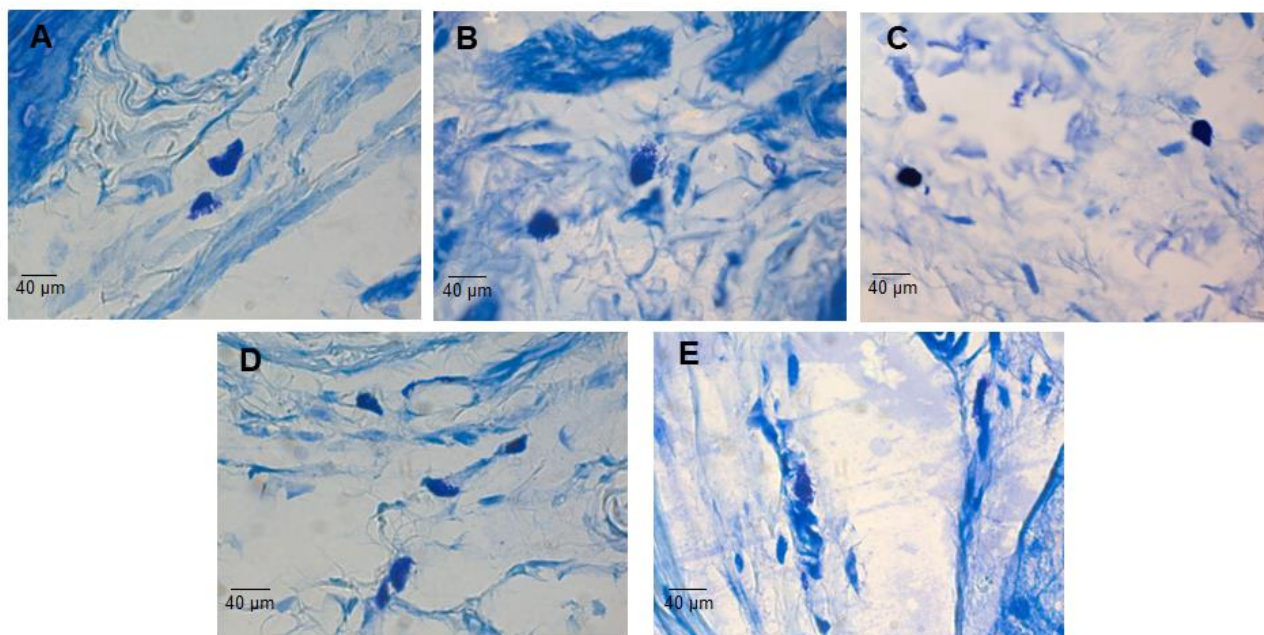
Nos animais tratados com N-Carb-Glu 30 minutos antes do desafio cutâneo (G3), observou-

se menor número de mastócitos com alterações morfológicas evidentes, quando comparado ao grupo sensibilizado sem tratamento, com predomínio de células apresentando aspecto preservado (Figura 19-C).

De modo semelhante, as amostras provenientes dos animais tratados com N-Carb-Glu 24 horas e 30 minutos antes do desafio cutâneo (G5) apresentaram mastócitos majoritariamente íntegros e menor evidência de alterações estruturais associadas à desgranulação, quando comparadas ao grupo G5 (Figura 19-D).

Por outro lado, nos animais tratados com N-Carb-Glu após a realização do teste cutâneo (G4), observaram-se alterações histológicas semelhantes às do grupo sensibilizado sem tratamento, com presença de mastócitos desgranulados (Figura 19-E).

Figura 19. Avaliação histológica da ativação mastocitária após desafio cutâneo. Cortes histológicos corados com Azul de Toluidina evidenciam a morfologia e o grau de degranulação mastocitária nos diferentes grupos experimentais. (A) G1, controle; (B) G2, sensibilizado sem tratamento; (C) G3, tratado 30 min antes; (D) G5, tratado 24 h + 30 min antes; (E) G4, tratado após o teste cutâneo.



4.4.2. Avaliação ultraestrutural da resposta cutânea por microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultraestrutural do tecido cutâneo por microscopia eletrônica de transmissão revelou diferenças marcantes entre os grupos experimentais. No grupo controle (G1), composto por animais sensibilizados apenas com solução salina (Figura 20.), observou-se organização tecidual preservada, com presença de macrófagos dispersos no estroma e ausência de mastócitos ou sinais morfológicos de ativação celular.

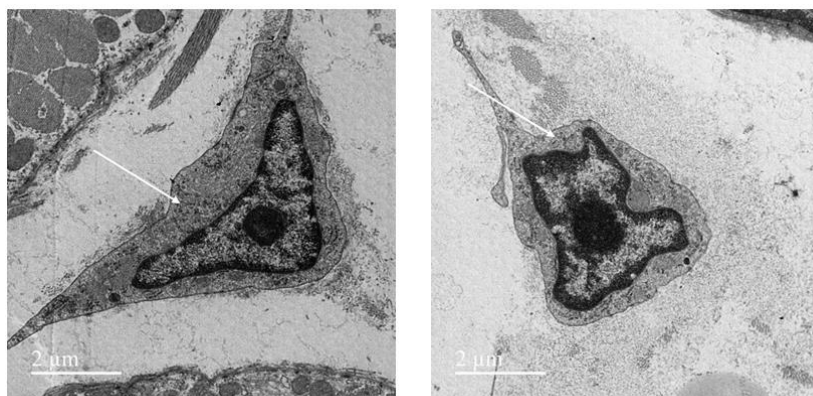


Figura 20. Microscopia Eletrônica de Transmissão do tecido da pata de animais controle (G1), sensibilizados com solução salina. Note a presença de macrófagos (setas) e a ausência de mastócitos.

No grupo de animais alérgicos sem tratamento (G2), conforme ilustrado na **Figura 21.**, foram identificados mastócitos com evidente processo de degranulação, caracterizado pela redução da densidade eletrônica dos grânulos citoplasmáticos e pela liberação de conteúdo granular para o meio extracelular. Esse padrão ultraestrutural é compatível com ativação mastocitária decorrente do desafio antigênico.

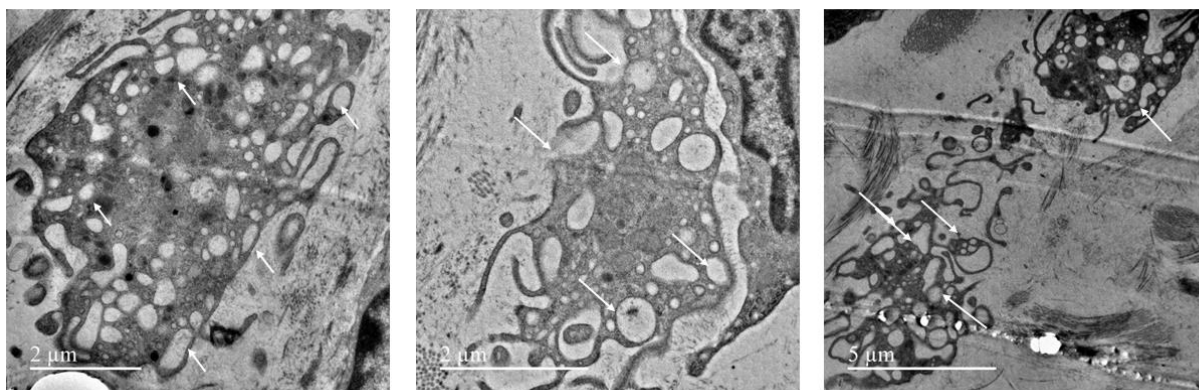


Figura 21. Microscopia Eletrônica de Transmissão do tecido da pata de animais alérgicos sem tratamento (G2). Note a presença de mastócitos desgranulados (setas).

Nos animais alérgicos tratados com N-Carb-Glu previamente ao teste cutâneo (G3) (**Figura 22.**), observou-se presença de macrófagos e mastócitos com grânulos citoplasmáticos preservados, sem evidências morfológicas de degranulação. Os mastócitos apresentaram citoplasma rico em grânulos eletrondensos, indicando manutenção da integridade estrutural dessas células.

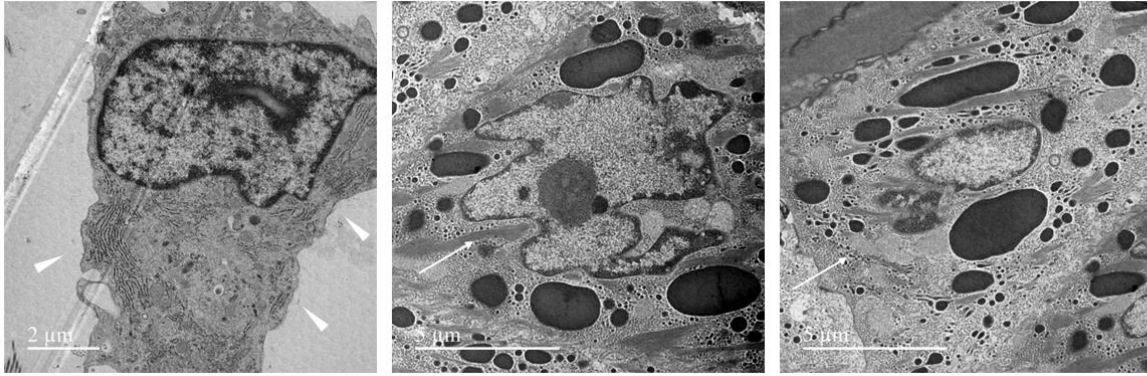


Figura 22. Microscopia Eletrônica de Transmissão do tecido da pata de animais alérgicos que receberam 1 tratamento (30 minutos antes do teste cutâneo – G3). Note a presença de macrófagos (cabeça de seta) e mastócitos ricos em grânulos (sem degranulação – setas).

Por sua vez, nos animais que receberam o tratamento após a realização do teste cutâneo (G4) (**Figura 23.**), foram observados macrófagos e linfócitos no tecido analisado, não sendo evidenciada presença de mastócitos íntegros na área examinada.

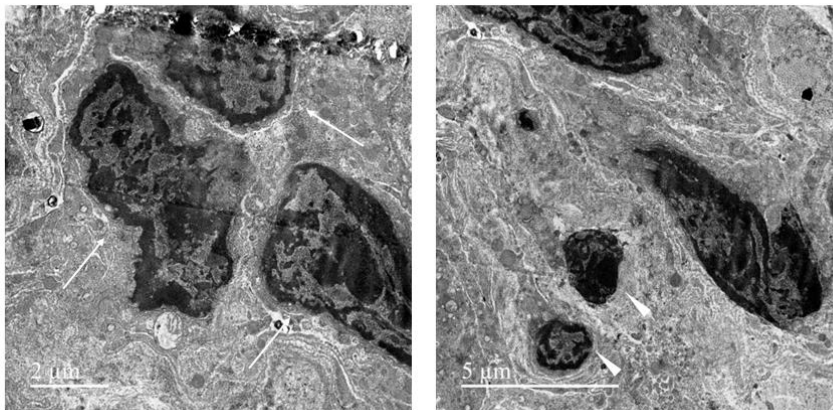


Figura 23. Microscopia Eletrônica de Transmissão do tecido da pata de animais alérgicos que receberam 1 tratamento após o teste cutâneo (G4). Note a presença de macrófagos (setas) e linfócitos (cabeças de setas) e a ausência de mastócitos.

5. DISCUSSÃO

As doenças alérgicas constituem um relevante problema de saúde pública, sendo caracterizadas por respostas imunológicas exacerbadas mediadas predominantemente pela imunoglobulina E (IgE), cuja interação com alérgenos desencadeia a ativação de células efetoras e a manifestação clínica da alergia (ABBAS et al., 2019). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial do N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu) como agente bloqueador funcional da IgE em um modelo experimental de alergia, bem como investigar seu perfil toxicológico e inflamatório em células do sistema imunológico.

A abordagem adotada combinou ensaios *in vitro*, voltados à avaliação de segurança e modulação inflamatória, com ensaios *in vivo* destinados à validação funcional do bloqueio da resposta alérgica mediada por IgE. Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que o N-Carb-Glu apresenta perfil de segurança favorável, capacidade de interferir seletivamente em mediadores inflamatórios e eficácia no bloqueio da resposta alérgica imediata, reforçando seu potencial como candidato promissor para estratégias terapêuticas baseadas na interferência direta da interação IgE-alérgeno.

A avaliação da citotoxicidade constitui uma etapa fundamental na triagem inicial de compostos candidatos a agentes terapêuticos, uma vez que permite assegurar que os efeitos biológicos observados não resultem em perda de viabilidade celular (RISS et al., 2016). Nos ensaios realizados, o N-Carb-Glu não apresentou citotoxicidade significativa em macrófagos RAW 264.7 nas concentrações testadas, mantendo a viabilidade celular acima de 80% mesmo na maior concentração avaliada (100 μ M). Esse perfil é semelhante ao observado para outros compostos com potencial anti-alérgico descritos na literatura, como a apigenina e o saponarin, cujos efeitos imunomoduladores foram investigados somente após a confirmação da ausência de citotoxicidade em linhagens celulares como RAW 264.7 e RBL-2H3 (PARK et al., 2020; MIN et al., 2021).

A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativado está associada à indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e à ativação de vias inflamatórias, sendo amplamente descrita como um componente da resposta inflamatória imune (BOGDAN, 2001). No presente estudo, o tratamento com N-Carb-Glu não promoveu modulação significativa da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados, indicando que o composto não atua por meio da supressão global da ativação inflamatória. Esse comportamento difere do observado para compostos como saponarin e apigenina, que apresentaram redução significativa da produção de NO, associada a uma modulação inflamatória mais ampla (MIN et al., 2021; PARK et al., 2020). A ausência de efeito do N-Carb-Glu sobre a produção de NO não deve ser interpretada como uma limitação, mas sim como um indicativo de que seus efeitos biológicos podem estar relacionados a mecanismos distintos da inibição clássica da resposta inflamatória, possivelmente envolvendo a interferência em eventos específicos da resposta alérgica mediada por IgE.

O ensaio de DPPH é utilizado em estudos experimentais para avaliar a capacidade de compostos atuarem como sequestradores diretos de radicais livres, refletindo propriedades antioxidantes clássicas (YAMAUCHI et al., 2024). Os resultados obtidos demonstraram que o N-Carb-Glu não apresentou atividade antioxidante significativa nesse ensaio, indicando ausência de capacidade relevante de neutralização direta de radicais livres. Esse resultado difere do observado para compostos como apigenina e saponarin, que demonstraram atividade antioxidante mensurável

no ensaio de DPPH, associada aos seus efeitos anti-inflamatórios e anti-alérgicos (PARK et al., 2020; MIN et al., 2021). A ausência de atividade antioxidante do N-Carb-Glu sugere que seu mecanismo de ação não envolve propriedades antioxidantes diretas, reforçando a noção de que seus efeitos biológicos não estão relacionados ao sequestro direto de espécies reativas, mas sim a uma interferência mais específica em vias moleculares associadas à resposta alérgica.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória central produzida por macrófagos ativados, desempenhando papel relevante na amplificação da resposta inflamatória, no recrutamento celular e na modulação da permeabilidade vascular (BRADLEY, 2008; ABBAS et al., 2019). No presente estudo, o tratamento com N-Carb-Glu promoveu redução significativa da produção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7, efeito observado em todas as concentrações avaliadas e dependente da concentração do composto. A magnitude dessa modulação foi corroborada pelo valor de IC₅₀ de 8,2 \pm 2,5 μ M, indicando que o N-Carb-Glu exerce efeito inibitório mensurável sobre a produção dessa citocina em concentrações relativamente baixas. Resultados semelhantes foram descritos para compostos com potencial anti-inflamatório e anti-alérgico, como a saponarina e a apigenina, que demonstraram reduzir significativamente a produção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (MIN et al., 2021; PARK et al., 2020).

Considerando que o TNF- α participa da amplificação da resposta inflamatória associada à ativação de células efetoras, sua redução pode contribuir para limitar a intensificação da resposta imune sem necessariamente comprometer mecanismos basais de defesa.

A citocina IL-1 β é uma importante mediadora pró-inflamatória produzida principalmente por células da imunidade inata, estando associada à amplificação da resposta inflamatória e à ativação de sinais que favorecem o recrutamento celular. Membros da família IL-1, da qual IL-1 β faz parte, estão intimamente relacionados à ativação de respostas inflamatórias na imunidade inata (DINARELLO, 2018; BORASCHI et al., 2022). Observou-se, nas condições avaliadas, redução significativa e dependente da concentração da produção de IL-1 β em macrófagos tratados com N-Carb-Glu, indicando um efeito modulador seletivo sobre mediadores inflamatórios. A magnitude dessa redução foi corroborada pelo valor de IC₅₀ de 9,2 μ M, indicando que o efeito do N-Carb-Glu sobre a produção de IL-1 β ocorre em baixas concentrações. Resultados semelhantes foram descritos para compostos como saponarin e neferina, que demonstraram capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias sem induzir citotoxicidade, sugerindo um perfil de modulação inflamatória direcionada (MIN et al., 2021; CHIU et al., 2021). Diferentemente de compostos com ação anti-inflamatória ampla, a modulação seletiva de IL-1 β observada neste estudo, associada à ausência de efeitos sobre a produção de óxido nítrico e atividade antioxidante, reforça a hipótese de que o N-Carb-Glu atua por meio de mecanismos específicos, possivelmente relacionados à interferência em eventos iniciais da resposta alérgica mediada por IgE.

A modulação simultânea de TNF- α e IL-1 β sugere que o N-Carb-Glu interfere em vias associadas à ativação inflamatória macrófágica, atuando sobre mediadores-chave da resposta imune inata. A redução dessas citocinas, sem evidência de citotoxicidade ou supressão global da resposta inflamatória, indica um perfil de ação direcionado, potencialmente relevante para a modulação da resposta alérgica mediada por IgE.

Em conjunto, os ensaios *in vitro* conduzidos para investigar o perfil toxicológico e inflamatório do N-Carb-Glu demonstram que o composto apresenta segurança celular e promove modulação inflamatória seletiva. A ausência de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 assegura que os efeitos observados não decorrem de comprometimento da viabilidade celular. Adicionalmente, a ausência de modulação da produção de óxido nítrico e de atividade antioxidante no ensaio de DPPH indica que o N-Carb-Glu não atua por meio da supressão inflamatória global nem da neutralização inespecífica de espécies reativas. Em contraste, a redução significativa e dependente da concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β evidencia um efeito modulador específico sobre mediadores associados à resposta imune inata. Esses achados sustentam a hipótese de que o N-Carb-Glu exerce seus efeitos por mecanismos direcionados, possivelmente relacionados à interferência em etapas iniciais da resposta alérgica mediada por IgE, o que justifica a investigação de sua eficácia funcional em modelos *in vivo*.

A validação do modelo experimental de alergia mediada por IgE foi confirmada pelo aumento significativo dos níveis séricos de IgE e IgG1, bem como da citocina IL-4, após o protocolo de sensibilização adotado. A elevação concomitante dessas imunoglobulinas e da IL-4 caracteriza uma resposta imune do tipo Th2, típica de modelos experimentais de alergia mediada por IgE. A produção de IL-4 desempenha papel central na polarização Th2 e na indução da troca de classe para IgE e IgG1 em camundongos, sendo amplamente descrita na literatura imunológica (ABBAS et al., 2019; PAUL, 2010). Protocolos de sensibilização com duração aproximada de 28 dias, como o originalmente proposto por Chen et al. (2013) e posteriormente avaliado por Arámburo-Gálvez et al. (2018), são eficazes para a indução desse perfil imunológico em camundongos BALB/c.

Os resultados obtidos no teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA) demonstraram que o tratamento prévio com N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu) foi capaz de reduzir significativamente o extravasamento vascular e o edema cutâneo induzidos pelo desafio antigênico, indicando uma diminuição da permeabilidade vascular associada à ativação mastocitária dependente de IgE. Esse perfil é consistente com achados previamente descritos por Campos-Mesquita (2020), que demonstrou que a administração de ácido L-glutâmico em camundongos sensibilizados resultou em redução da reação cutânea alérgica, atribuída ao bloqueio funcional da interação IgE-alérgeno. Adicionalmente, a ausência de efeito quando o N-Carb-Glu foi administrado após a realização do teste cutâneo reforça a hipótese de que o composto atua predominantemente em eventos iniciais da

cascata alérgica, interferindo na interação entre a IgE e o alérgeno. No entanto, enquanto o estudo anterior utilizou o aminoácido livre, o presente trabalho avança ao demonstrar que uma modificação química do ácido glutâmico preserva a capacidade de interferir na resposta alérgica imediata *in vivo*, reforçando o potencial dessa estratégia como abordagem terapêutica direcionada.

As análises histológicas corroboraram os achados funcionais observados no teste de PCA. Nos animais sensibilizados e não tratados, observou-se maior presença de mastócitos desgranulados na região do desafio cutâneo, característica típica da resposta alérgica imediata. Em contraste, os animais tratados com N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu) previamente ao desafio apresentaram mastócitos predominantemente íntegros, com menor evidência de desgranulação. Esses achados indicam que o tratamento com o composto foi capaz de reduzir a ativação mastocitária *in vivo*, reforçando o bloqueio funcional da resposta mediada por IgE. A concordância entre os dados macroscópicos, funcionais e morfológicos fortalece a interpretação de que o N-Carb-Glu interfere de forma efetiva na ativação de mastócitos dependente de IgE, sustentando o mecanismo proposto para sua ação anti-alérgica.

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão aprofundou os achados observados na microscopia óptica, permitindo a caracterização detalhada do estado funcional dos mastócitos na região do desafio cutâneo. Nos animais alérgicos não tratados, foram identificados mastócitos com evidente processo de degranulação, caracterizado pela diminuição da densidade eletrônica dos grânulos citoplasmáticos e pela liberação de seu conteúdo para o meio extracelular, padrão compatível com ativação mastocitária dependente de IgE. Em contraste, nos animais tratados com N-Carb-Glu previamente ao desafio cutâneo, observou-se preservação da integridade ultraestrutural dos mastócitos, com manutenção da morfologia celular e presença de grânulos citoplasmáticos eletrondensos, sem sinais evidentes de exocitose, confirmando, em nível subcelular, a redução da ativação mastocitária previamente sugerida pelos dados funcionais do PCA e pelas análises histológicas. Além disso, a ausência de efeito quando o tratamento foi administrado após o desafio cutâneo encontra suporte na análise ultraestrutural, uma vez que não se observou reversão do padrão morfológico compatível com ativação mastocitária já estabelecida. Esse conjunto de evidências reforça a hipótese de que o N-Carb-Glu atua predominantemente em etapas iniciais da cascata alérgica, interferindo na interação IgE-alérgeno antes da ocorrência da degranulação mastocitária. A concordância entre os achados funcionais, histológicos e ultraestruturais confere robustez à interpretação de que o N-Carb-Glu exerce efeito anti-alérgico por meio da modulação direta da ativação mastocitária, consolidando o mecanismo proposto para sua ação *in vivo*.

Em conjunto, os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* demonstram que o N-carbamil-L-ácido glutâmico exerce um efeito modulador consistente sobre a resposta alérgica mediada por IgE. A validação do modelo experimental, confirmada pela indução de uma resposta imune do tipo Th2,

assegurou um contexto imunológico adequado para a avaliação funcional do composto. Nesse cenário, o tratamento prévio com N-Carb-Glu promoveu redução significativa da reação alérgica imediata no teste de anafilaxia cutânea passiva, efeito corroborado pela diminuição da desgranulação mastocitária observada nas análises histológicas e confirmado, em nível ultraestrutural, pela preservação da integridade dos mastócitos evidenciada por microscopia eletrônica de transmissão. A ausência de efeito quando o composto foi administrado após o desafio antigênico reforça a hipótese de que sua ação ocorre predominantemente em eventos iniciais da cascata alérgica, possivelmente por interferência na interação entre a IgE e o alérgeno. A convergência entre os dados imunológicos, funcionais e morfológicos, em diferentes níveis de análise, sustenta a interpretação de que o N-Carb-Glu atua de forma direcionada na resposta alérgica imediata, evidenciando seu potencial como estratégia alternativa para o bloqueio da IgE *in vivo*.

Os achados deste estudo estão de acordo com resultados previamente descritos pelo grupo de pesquisa, que demonstraram a importância de resíduos de ácido glutâmico presentes em epítopos ligantes de IgE de alérgenos, como Ric c1 e Ric c3, para a ligação cruzada da IgE e a subsequente desgranulação mastocitária. A utilização de um derivado estruturalmente modificado do ácido glutâmico, como o N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu), representa um avanço conceitual dessa linha de investigação, ao demonstrar que a modificação química do aminoácido preserva a capacidade de interferir na interação IgE-alérgeno, agora validada funcionalmente em um modelo *in vivo* de alergia. Dessa forma, o presente trabalho contribui para o fortalecimento da hipótese de que estratégias terapêuticas baseadas no bloqueio molecular da IgE podem representar uma alternativa promissora às abordagens convencionais atualmente disponíveis.

Apesar dos resultados promissores, este estudo apresenta algumas limitações. A avaliação foi realizada utilizando um único modelo alergênico e um número limitado de animais, além de não contemplar protocolos de exposição crônica ou análises farmacocinéticas do composto. Estudos futuros são necessários para investigar a eficácia do N-Carb-Glu em outros modelos de alergia, incluindo diferentes fontes alergênicas, bem como para aprofundar a compreensão de seus mecanismos moleculares de ação e seu potencial translacional.

Em conjunto, os resultados obtidos ao longo deste estudo demonstram que o N-carbamil-L-ácido glutâmico apresenta perfil de segurança favorável e é capaz de promover o bloqueio funcional da IgE *in vitro* e *in vivo*, interferindo na ativação mastocitária e na resposta alérgica imediata. Esses achados reforçam o potencial do N-Carb-Glu como candidato promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras no tratamento das doenças alérgicas, baseadas na interferência direta da interação IgE-alérgeno.

6. CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo evidenciam o potencial do N-carbamil-L-ácido glutâmico (N-Carb-Glu) como uma nova abordagem terapêutica para doenças alérgicas, pois:

- O N-Carb-Glu demonstrou um perfil de segurança celular favorável *in vitro*, não exibindo citotoxicidade em macrófagos murinos (RAW 264.7 e J774A.1) nas concentrações testadas (0,8 a 100 μ M);
- Seus efeitos biológicos não se mostraram associados à supressão inflamatória inespecífica ou à neutralização de espécies reativas, uma vez que o composto não modulou a produção de óxido nítrico nem apresentou atividade antioxidante;
- Em contraste, o N-Carb-Glu promoveu uma redução significativa e dose-dependente na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em macrófagos, indicando um efeito modulador seletivo sobre mediadores inflamatórios da resposta imune inata;
- O modelo experimental *in vivo* de alergia mediada por IgE foi estabelecido com sucesso, caracterizado pelo aumento significativo dos níveis séricos de IgE, IgG1 e IL-4, confirmando uma resposta imune do tipo Th2;
- No teste cutâneo, o tratamento prévio com N-Carb-Glu reduziu significativamente o extravasamento vascular e o edema cutâneo induzidos pelo desafio antigênico, evidenciando o bloqueio funcional da resposta alérgica imediata dependente de IgE;
- Os resultados obtidos demonstram que o N-Carb-Glu não exerce efeito protetor quando administrado após o desafio antigênico, sugerindo um mecanismo de ação associado à modulação precoce da resposta alérgica, possivelmente por interferência direta na interação IgE-alérgeno; Corroborando os achados funcionais, as análises histológicas e ultraestruturais revelaram redução da desgranulação mastocitária e preservação da integridade dos mastócitos nos animais tratados preventivamente com N-Carb-Glu.

Em suma, estes achados destacam que o N-Carb-Glu exerce um efeito modulador direcionado e seguro sobre a resposta alérgica mediada por IgE. Isso o estabelece como um candidato promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras, baseadas no bloqueio molecular da interação IgE-alérgeno, oferecendo uma alternativa ou complemento valioso às abordagens atuais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, Rob C. Structural biology of allergens. **Journal of allergy and clinical immunology**, v.

106, n. 2, p. 228-238, 2000.

ABBAS, A. K. et al. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier, 9 ed, 2019

AHMAD, Suhana et al. The key role of TNF-TNFR2 interactions in the modulation of allergic inflammation: a review. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2572, 2018.

ARÁMBURO-GALVEZ, Jesús Gilberto et al. Assessment of the sensitizing potential of proteins in BALB/c mice: Comparison of three protocols of intraperitoneal sensitization. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 903, 2018.

BARTHOLAZZI, Mariana Giarola Benedito; DE MORAIS LODI, Tatiana; MACHADO, Olga Lima Tavares. Current Developments in Allergen-Specific Immunotherapy: A Brief Review. **Allergic Disease-New Developments in Diagnosis and Therapy**, 2022.

BARTHOLAZZI, Mariana Giarola Benedito. *Produção de alérgeno mutante recombinante de Ricinus communis, Ric c 3, e avaliação da desgranulação de mastócitos e do desenvolvimento de larvas de Callosobruchus maculatus*. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2018.

BARTHOLAZZI, Mariana Giarola Benedito. *Expressão heteróloga, isolamento e caracterização imunológica de Ric c 3 mutante, proteína derivada de um importante alérgeno de Ricinus communis*. 2022. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2022.

BRADLEY, JR18161752. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

BOGDAN, Christian. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BORASCHI, Diana. What is IL-1 for? The functions of interleukin-1 across evolution. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 872155, 2022.

BOURSIQUOT, Jean-Nicolas et al. Allergen immunotherapy. **Allergy, Asthma & Clinical**

Immunology, v. 20, n. Suppl 3, p. 66, 2024.

BREITENEDER, Heimo; RADAUER, Christian. A classification of plant food allergens. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 113, n. 5, p. 821-830, 2004.

BUFE, Albrecht. Significance of IgE-binding epitopes in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, n. 2, p. 219-221, 2001.

CAMELO-NUNES, Inês Cristina. New antihistamines: a critical view. **Jornal de pediatria**, v. 82, p. S173-S180, 2006.

CAMPOS MESQUITA, Débora Mothé de. *Abordagens alternativas para o tratamento da alergia: investigação de agentes bloqueadores de IgE*. 2016. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2016.

CAMPOS MESQUITA, Débora Mothé de. *Avaliação do bloqueio de IgE com ácido L-glutâmico como abordagem alternativa para o tratamento de doenças alérgicas*. 2020. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2020.

CANGEMI, José Marcelo; SANTOS, Antonia Marli dos; CLARO NETO, Salvador. A revolução verde da mamona. **Química Nova na Escola**, v. 32, n. 1, pág. 3-8, 2010.

CARRIELLO-GAMA, Camila . *Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epítomos alergênicos de Ricinus communis (mamona)*. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Biologia Celular) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.

CHEN, Chen et al. A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 41-47, 2013.

CHIU, Kuan-Ming et al. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of neferine on RBL-2H3 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 10994, 2021.

DE CAMPOS-MESQUITA, D.; SILVA DE SOUZA, G.; CARRERA, M.; GIRALDI-GUIMARÃES, A.; MACHADO, O. Blocking IgE with L-glutamic acid analogs as an alternative approach to allergy treatment. **European Journal of Biological Research**, v. 13, n. 1, pág. 31-40, 28 fev. 2023.

DE MORAIS LODI, Tatiana; BARTHOLAZZI, M. G. B. ; MACHADO, Olga Lima Tavares Tavares. Allergen Structures and Allergen-Specific Immunotherapy (ASIT). Allergen Structures and Allergen-Specific Immunotherapy (ASIT). 1ed. New York: Nova Science Publishers, 2024, v. 78, p. 35-62.

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

DINARELLO, Charles A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological reviews**, v. 281, n. 1, p. 8-27, 2018.

DURHAM, Stephen R.; SHAMJI, Mohamed H. Allergen immunotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 5, p. 317-328, 2023.

EDWARDS-SALMON, Sofia E. et al. Increasing prevalence of allergic disease and its impact on current practice. **Current Otorhinolaryngology Reports**, v. 10, n. 3, p. 278-284, 2022.

ENGEROFF, Paul *et al.* Allergens displayed on virus-like particles are highly immunogenic but fail to activate human mast cells. **Allergy**, v. 73, n. 2, p. 341-349, 2018.

FELIX, S.P. ; MAYERHOFFER, R.O. ; Damatta, R.A. ; Verícimo, M.A. ; Nascimento, V.V. ; Machado, O.L.T. . Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. **Peptides (New York, N.Y. 1980)**, v. 29, p. 497-504, 2008.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATIVE NETWORK. *Global Burden of Disease Study 2023 (GBD 2023) Results*. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2024. Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>. Acesso em: 07/01/2026.

GRIESS, J. P. On the diazotization of aromatic amines and the formation of azo compounds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 154, p. 679–706, 1864.

GUEDERS, Maud M. et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. **Inflammation research**, v. 58, n. 12, p. 845-854, 2009.

GUNAWARDANA, Natasha C.; DURHAM, Stephen R. New approaches to allergen immunotherapy. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 121, n. 3, p. 293-305, 2018.

HOLGATE, S. T. et al. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 35, n. 4, p. 408-416, 2005.

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

IRWIN, Stephen D. *et al.* The inus communis 2S albumin precursor: A single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 222, p. 400-408, 1990.

IVANCIUC, Ovidiu et al. The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. **Molecular immunology**, v. 46, n. 5, p. 873-883, 2009.

JANKOVIĆ, Vesna V. et al. Major allergens–The big nine. **Scientific journal" Meat Technology"**, v. 64, n. 2, p. 111-115, 2023.

LODI, Tatiana de Moraes. *Prospecção de uma imunoterapia para o tratamento de alergias alimentares e abordagens experimentais baseadas em estudos in silico de epítopos de células B e T através de ferramentas de bioinformática*. 2023. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2023.

MACHADO, O. L. T.; SILVA Jr, J. G. An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is a part of the 2s albumin precursor predicted by c-DNA data. **Brazilian Journal of**

Medical and Biological Research, Brasil, v. 25, p. 567-582, 1992.

MACHADO, O. L. T.; MARCONDESDESOUZA, J. A. ; SILVA, F. S. ; RIBEIRO, P. D. ; VERÍCIMO, M. M. ; KANASHIRO, M. ; SILVA Jr, J. G. ; SANTOS, M. F. ; COSTAESILVA, M. C. . Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. **Allergologie , Alemanha**, v. 26, n.2, p. 45-51, 2003.

MENDIETA, Ana Flávia Ribeiro. *Avaliação toxicológica e análise comportamental do N-carbamil-L-ácido glutâmico, agente bloqueador de IgE, como estratégia alternativa para o tratamento da alergia*. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2023.

MIN, Seon-Young et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of saponarin and its impact on signaling pathways of RAW 264.7, RBL-2H3, and HaCaT Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8431, 2021.

MOLYNEUX, Philip et al. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. sci. technol**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORENO, F. Javier; CLEMENTE, Alfonso. 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens?. **The open biochemistry journal**, v. 2, p. 16, 2008.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, Viviane Veiga Do et al. In silico structural characteristics and α -amylase inhibitory properties of Ric c 1 and Ric c 3, allergenic 2S albumins from *Ricinus communis* seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4814-4821, 2011.

NICIU, Mark J. et al. Glutamate receptor antagonists as fast-acting therapeutic alternatives for the treatment of depression: ketamine and other compounds. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 54, n. 1, p. 119-139, 2014.

NIU, Jingyi; LI, Minai; WANG, Ying. Cell proliferation and cytotoxicity assays, the fundamentals for drug discovery. **International Journal of Drug Discovery and Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 100013, 2024.

OVARY, Zoltan. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **The Journal of Immunology**, v. 81, n. 4, p. 355-357, 1958.

PACHECO-SOARES, Thaís et al. A modified, hypoallergenic variant of the Ricinus communis Ric c1 protein retains biological activity. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, p. BSR20171245, 2018.

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

PARK, Che-Hwon et al. Effects of apigenin on RBL-2H3, RAW264. 7, and HaCaT cells: anti-allergic, anti-inflammatory, and skin-protective activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4620, 2020.

PAUL, William E. What determines Th2 differentiation, *in vitro* and *in vivo*?. **Immunology and cell biology**, v. 88, n. 3, p. 236-239, 2010.

PRYBYLOWSKI, Kate; WENTHOLD, Robert J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 9673-9676, 2004.

RAMCHANDANI, Rashi; HOSSENBACCUS, Lubnaa; ELLIS, Anne K. Immunoregulatory T cell epitope peptides for the treatment of allergic disease. **Immunotherapy**, v. 13, n. 15, p. 1283-1291, 2021.

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

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

18, 1996.

SMALDINI, Paola Lorena et al. Orally-induced intestinal CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg controlled undesired responses towards oral antigens and effectively dampened food allergic reactions. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0141116, 2015.

TABAR, Ana Isabel et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled trial of allergen specific immunotherapy with the major allergen Alt a 1. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 144, n. 1, p. 216-223. e3, 2019.

THORPE, S. C. et al. Allergy to castor bean: I. Its relationship to sensitization to common inhalant allergens (atopy). **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 82, n. 1, p. 62-66, 1988.

VIEIRA, M.R. 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, 2002.

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

YAMAUCHI, Moeka et al. DPPH measurements and structure—Activity relationship studies on the antioxidant capacity of phenols. **Antioxidants**, v. 13, n. 3, p. 309, 2024.

ZIEGLMAYER, Petra et al. Mechanisms, safety and efficacy of a B cell epitope-based vaccine for immunotherapy of grass pollen allergy. **EBioMedicine**, v. 11, p. 43-57, 2016.

ANEXO 1. CEUA



Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

REITORIA Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 617, intitulado “AVALIAÇÃO DO N-CARBAMIL-L-ÁCIDO GLUTÂMICO, BLOQUEADOR DE IgE, COMO NOVA ABORDAGEM PARA O TRATAMENTO DA ALERGIA” sob a responsabilidade da Dra. Olga Lima Tavares Machado, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11. 794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 20/05/2025. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 20/05/2029.

Campos dos Goytacazes, 20 de maio de 2025.

Clóvis de Paula Santos

Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais