Anne Karoline Rocha Medrado Ventura

**Identificação de proteínas IgE- reativas do camarão sete-
barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza
Santos

**SÃO PAULO
2018**

Anne Karoline Rocha Medrado Ventura

**Identificação de proteínas IgE- reativas do camarão sete-
barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza
Santos

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ventura, Anne Karoline Rocha Medrado
Identificação de proteínas IgE- reativas do
camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) / Anne
Karoline Rocha Medrado Ventura. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Keity Souza Santos.

Descritores: 1.Hipersensibilidade alimentar
2.Hipersensibilidade a frutos do mar 3.Camarão
4.Crustáceos 5.Alérgenos 6.Western blotting
7.Proteoma

USP/FM/DBD-057/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedico essa dissertação a minha mãe pelo incentivo e apoio incondicional em todas as minhas escolhas e por sempre acreditar em mim mesmo quando nem eu mesma acreditei sem ela nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Keity Souza Santos por me acolher como sua aluna, pela confiança, amizade e paciência. Ao meu grupo: Karine, Daniele, Fernanda e Susanne, pela ajuda e amizade. Pessoas importantes sempre dispostas a ajudar Juliana, Cássia e Priscilla e todos os colegas e amigos do LIM 60 que me deram força e me acolheram com tanto carinho. À Candida e ao Issler, pela ajuda essencial nesses últimos meses. À Dra. Paula Meireles pela disponibilização das amostras do seu projeto para a realização dos meus experimentos. À Dra. Ariana Yang pelo acompanhamento clínico dos pacientes deste estudo, pelas discussões, esclarecimentos de dúvidas e contribuição científica. Ao Prof. Dr. Jorge Kalil por me acolher como aluna do seu departamento. À Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos do CEVAP- UNESP Botucatu pela colaboração. À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro. Por último e mais importante, à Deus por ter me dado sabedoria e forças para chegar até aqui e minha mãe pelo apoio e paciência durante todo o processo.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de “International Committee of Medical Journals Editors” (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Alergia	1
1.1.1.	Principais doenças alérgicas IgE mediadas.....	3
1.2	Alergia Alimentar.....	4
1.2.1.	Diagnóstico e tratamento das alergias alimentares.....	5
1.3	Alergia a frutos do mar.....	6
1.4.1.	<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	10
1.4	Reatividade cruzada	11
1.5	Alergologia molecular e Medicina de precisão	12
2.	JUSTIFICATIVA	14
3.	OBJETIVOS	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Aprovação ética.....	16
4.2.	Recrutamento dos indivíduos	16
4.3.	Pesquisa de IgE específica in vitro (ImmunoCAP)	21
4.4.	Extração proteica da carne e da casca do camarão	22
4.5.	Eletroforese 1D e 2D	23
4.6.	Western Blotting	24
4.7.	Identificação das proteínas	26
4.7.1.	Digestão <i>in gel</i> para <i>spots</i> excisados do gel 2D.....	26
4.7.2.	Identificação das proteínas por espectrometria de massas	27
4.7.3.	Análise dos dados.....	28
4.8.	Análise estatística.....	29
5.	RESULTADOS	30
6.	DISCUSSÃO	42
7.	CONCLUSÃO	52
8.	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
1D	Primeira dimensão
2D	Segunda dimensão
BSA	Albumina bovina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEVAP	Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
DTT	Ditioltreitól
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Sulfato de 3-(3-Colamidopropil)-dimetil-amônio-1-propano
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H	Hora
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido clorídrico
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IEF	Focalização isoeletrica
IgE	Imunoglobulina E
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i>
KCl	Cloreto de potássio
KdA	Quilodalton
LIM	Laboratório de Investigação Médica
M	Molar
m/v	Molaridade/volume
mA	Miliampère
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Marcador Molecular

MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (<i>in tandem</i>)
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
pNPP	Paranitrofenil fosfato
rcf	Força Centrifuga Relativa
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBS	Tampão Tris salino
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TCLI	Teste Cutâneo de Leitura Imediata
TPO	Teste de Provocação Oral
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
WB	<i>Western blotting</i>
v/v	Volume\volume
Vh	Volt hora

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Camarão <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> – Extraído de: IBAMA, (2011).....	10
Figura 2	Eletroforese 1D dos extratos de <i>X. kroyeri</i> pescados em Janeiro (A) e Junho (B) de 2017. A regiões destacadas evidenciam as diferenças entre eles. Marcador molecular (MM), extratos da carne do camarão (CM) e da casca (CS) respectivamente em gel SDS 10%.....	23
Figura 3	Agrupamento dos indivíduos alérgicos incluídos no estudo com base nos resultados de ImmunoCAP.....	32
Figura 4	<i>Western Blotting</i> 1D com pool soro de todos os indivíduos alérgicos e não alérgicos frente proteínas de carne de camarão e casca de camarão. As regiões destacadas indicam diferença de reconhecimento entre carne e casca. Marcador de peso molecular (MM), camarão (CM) e casca (CS).....	33
Figura 5	<i>Western Blotting</i> 1D da carne e casca do camarão para cada indivíduo alérgico separado em grupos considerando os resultados de ImmunoCAP conforme mostrado na figura 4. A região destacada em verde mostra a região de reconhecimento da tropomiosina. As linhas tracejadas indicam as regiões que apresentavam diferença de reconhecimento entre camarão e casca quando testado contra o <i>pool</i> de soros. Neg – negativo, Pos – Positivo, tropo – tropomiosina, marcador de massa molecular (MM), extrato da casca do camarão (CS), indivíduos alérgicos (1-18) e controle negativo do anticorpo secundário (AS).....	34
Figura 6	<i>Western Blotting</i> 1D para os indivíduos não alérgicos. A - Carne do camarão e B - casca do camarão. Marcador de massa molecular (MM), extrato da carne do camarão (CM), extrato da casca do camarão (CS) e indivíduos não alérgicos (19-27). O tracejado em vermelho mostra a região de reconhecimento da tropomiosina.....	35
Figura 7	(A) Eletroforese 2D em gel de acrilamida 10% do extrato da carne do camarão. (B) Eletroforese 2D em gel de acrilamida 10% do extrato da casca do camarão.....	36
Figura 8	Eletroforese 2D em gel de acrilamida 10% do extrato da carne do camarão (A)	

	extrato filtrado e (C) extrato não filtrado, com os spots reconhecidos pelos indivíduos alérgicos que foram excisados a partir do <i>Western Blotting</i> 2D (B e D) com <i>pool</i> de soro dos indivíduos alérgicos testados com extrato da carne do camarão.....	37
Figura 9	Eletroforese 2D em gel de acrilamida 10% do extrato da casca do camarão (A) extrato filtrado e (C) extrato não filtrado, com os spots reconhecidos pelos indivíduos alérgicos que foram excisados a partir do <i>Western Blotting</i> 2D (B e D) com <i>pool</i> de soro dos indivíduos alérgicos testados com extrato da casca do camarão.....	38
Figura 10	Alinhamento do gel 2D com <i>Western Blotting</i> 1D para determinação individual de reconhecimento IgE específico para as diferentes proteínas identificadas. A – Gel 2D do extrato de carne de camarão. B – Gel 1D do extrato de carne de camarão. C – <i>Western Blotting</i> 1D dos soros individuais. As cruzes indicam onde a proteína foi reconhecida. A região destacada em verde contém diversas proteínas dificultando a análise, portanto não é possível fazer a análise. CM – Carne de camarão.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alérgenos identificados em diferentes espécies de camarão.....	10
Tabela 2	Testes confirmatórios realizados nos indivíduos alérgicos a camarão e seus sintomas clínicos e resultados de ImmunoCAP dos não alérgicos.....	17-20
Tabela 3	Dados demográficos dos indivíduos selecionados para o estudo.....	20
Tabela 4	Identificações obtidas a partir da análise de espectrometria de massas dos spots excisados do gel 2D com ponto isoelétrico entre 4 e 7.....	39
Tabela 5	Valor de cada proteína IgE reativa identificada em relação à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência.....	41

RESUMO

Ventura AKRM. *Identificação de proteínas IgE- reativas do camarão sete-barbas (Xiphopenaeus kroyeri)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A alergia alimentar tem se tornado um problema crescente de saúde pública em muitos países e pode ser desencadeada por qualquer alimento. Em crianças os alimentos considerados mais alergênicos são leite de vaca e ovo e em adultos há uma alta frequência de alergia a frutos do mar, sendo camarão o marisco considerado mais alergênico. Clinicamente a alergia a camarão pode se manifestar em diferentes formas como dermatite atópica, angioedema ou até mesmo anafilaxia. Com base na história clínica e avaliação de resultados de exames complementares foram selecionados 18 indivíduos alérgicos a camarão e 9 não alérgicos como grupo controle. Foram realizados testes *in vitro* para dosagem de IgE específica no soro e teste cutâneo. Para reações ocorridas há mais de um ano foi realizada provocação oral para confirmação diagnóstica. O soro de todos os indivíduos do estudo foram testados em Western Blotting 1D e 2D com extrato de carne de camarão e casca separadamente da espécie *Xiphopenaeus kroyeri*, que possui grande importância por ser altamente consumida em nosso país além de estar entre as dez estirpes mais capturadas no mundo. Ainda assim não está presente em nenhum teste comercial disponível e não há nenhum alérgeno descrito para o mesmo. A caracterização de suas moléculas alergênicas é importante para melhor auxílio no diagnóstico e tratamento de pacientes alérgicos. As proteínas que apresentaram reatividade IgE específica foram submetidas a espectrometria de massas para identificação. Foi possível identificar alguns homólogos de alérgenos de outras espécies de camarão como, tropomiosina, arginina quinase, proteína sarcoplasmática de ligação ao cálcio, actina, cadeia leve e pesada de miosina e hemocianina. Encontramos um possível novo alérgeno denominado como citocromo c oxidase (subunidade I) que não foi descrito anteriormente como proteína alergênica. Analisando sensibilidade e valor preditivo positivo das nossas proteínas sugerimos que algumas delas podem ser boas candidatas como futuros marcadores diagnósticos para alergia a camarão. Quando comparamos o perfil de proteínas reativas em carne e casca de camarão não observamos diferenças significativas entre elas. Essa é a primeira descrição de alergia para a espécie de camarão *X. kroyeri*, popularmente conhecido como camarão sete barbas, mostrando reatividade a IgE específica em pacientes alérgicos a camarão.

Descritores: hipersensibilidade alimentar; hipersensibilidade a frutos do mar; camarão; crustáceos; alérgenos; western blotting; proteoma

ABSTRACT

Ventura AKRM. *Identification of IgE- reactive proteins from seven-bearded shrimp (Xiphopenaeus kroyeri)* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2018.

Food allergy has become a growing problem of public health in many countries, and can be triggered by any food. In children the most allergenic foods are cow's milk and egg; in adults there are high frequencies of allergy to seafood, and shrimps are considered the most allergenic seafood. Clinically, shrimp allergy can manifest itself in different forms, such as atopic dermatitis, angioedema or even anaphylaxis. Based on the clinical history and evaluation of the tests, we selected eighteen subjects that were allergic to shrimp, and nine non-allergic to shrimp as a control group. *In vitro* tests were performed to IgE specific dosage and cutaneous test with commercial extract. When reactions occurred more than one year before oral provocation test was performed for diagnostic confirmation. The serum of all individuals were tested in Western Blotting 1D and 2D with the shrimp meat and shell extracts separately from the species *Xiphopenaeus kroyeri*, which has great importance since is highly consumed in the Southeast region of our country and is among the top ten captured species in the world. Nevertheless, there are no commercial clinical tests available for it, and there is no specific allergen described, both of them would help the diagnosis and treatment of allergic patients. Proteins that showed specific IgE reactivity were submitted to mass spectrometry for identification. We identified some homologues allergens from other shrimp species such as tropomyosin, arginine kinase, calcium-binding sarcoplasmic protein, actin, myosin heavy chain and hemocyanin. We founded a possible new allergen called cytochrome c oxidase (subunit I), that was never previously described as an allergenic protein. Analyzing sensitivity and positive predictive value of our proteins we suggest that some of them may be good candidates as future diagnostic markers for shrimp allergy. When comparing the reactive proteins profile in shrimp meat and shell, we did not observe significant differences between them. This is the first description showing reactivity to specific IgE for shrimp species *X. kroyeri*, popularly known as shrimp seven beards, in patients allergic to shrimp.

Descriptors: food hypersensitivity; shellfish hypersensitivity; shrimp; crustacean; allergens; blotting; western; proteome

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alergia

A alergia não é a doença propriamente dita, mas sim um mecanismo que leva a doença, que pode se manifestar de diferentes formas como anafilaxia, urticária, angioedema, asma alérgica, doença do soro, dermatite de contato, entre outras¹. Trata-se de uma reação imunológica imediata, desencadeada através de uma reação exacerbada frente a uma variedade de antígenos inócua para grande parte da população, exceto indivíduos atópicos (geneticamente predispostos a desenvolver alergia). Hipersensibilidade do tipo I é causada por respostas imunes a antígenos ambientais e envolvem células T helper 2 (Th2), imunoglobulina E (IgE), mastócitos e eosinófilos. Os exemplos mais comuns de fontes de alérgenos envolvidos nas reações com participação de IgE são ácaros, epitélio de animais, alimentos, fungos, pólenes, venenos de insetos e medicamentos ².

O termo “hipersensibilidade” originou-se a partir da definição clínica de imunidade como “sensibilidade”, que se baseia na observação de que respostas imunológicas podem ser geradas inapropriadamente e exacerbadamente frente a um antígeno inócuo, em contatos subsequentes ^{2,3}.

Existem duas fases no desenvolvimento alérgico, a fase de indução (sensibilização) e a fase efetora (elicitación).

A fase de sensibilização consiste no primeiro contato do sistema imunológico com o alérgeno. Nessa fase acontece a diferenciação e ativação de células T em perfil Th2 e a estimulação da troca de classe para IgE em células B após contato com o alérgeno, que pode ocorrer numa primeira exposição ou ainda após inúmeras exposições

anteriores. O mecanismo que desencadeia esse processo ainda não é bem esclarecido. Sabe-se porém que essas IgEs específicas produzidas podem se ligar aos receptores de alta afinidade a IgE (FcεRI) nos mastócitos, tornando-os sensibilizados àquele alérgeno ^{2,4,5}.

A fase de elicitação é decorrente de exposições subsequentes do indivíduo anteriormente sensibilizado ao alérgeno. Nessa fase os mastócitos previamente sensibilizados são ativados por meio de ligação cruzada entre duas IgEs adjacentes ligadas ao receptor FcεRI promovidas pelo alérgeno ⁴⁻⁶. Uma vez ativados, esses mastócitos liberam histamina e mediadores químicos, que aumentam a permeabilidade vascular e estimulam a contração celular do músculo liso segundos após a exposição ^{1,2}. Uma resposta tardia pode se desencadear entre 8 a 12 horas após contato com o alérgeno. Os mastócitos e outras células como macrófagos produzem mais citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular que agem na produção, recrutamento e ativação de eosinófilos para o tecido, ativando-os. Eosinófilos ativados liberam citocinas e mediadores pró-inflamatórios, promovendo entre outros, danos teciduais ^{2,7}.

Dependendo do tecido afetado, essas reações de hipersensibilidade se manifestam de maneiras diferentes. Os sistemas mais comumente acometidos são tegumentar (urticária, angioedema), gastrointestinal (dor abdominal, vômitos, diarreia), cardiopulmonar (aumento de batimentos cardíacos, hipotensão, tosse). A forma mais grave da reação de hipersensibilidade imediata é a anafilaxia, que é caracterizada pelo acometimento de pelo menos dois sistemas, geralmente pele e mais um ⁸.

Anafilaxia é uma reação de hipersensibilidade aguda potencialmente fatal, que inclui sinais e sintomas, isolados ou combinados. O termo “anafilaxia” é empregado para descrever reação imunológica mediada por IgE, já o termo “anafilaxia não alérgica

ou reação anafilactóide” é usado para reação clinicamente idêntica, porém independente do envolvimento de IgE. Entretanto, o diagnóstico e manejo clínico não diferem ⁹.

As manifestações clínicas da anafilaxia podem ser de intensidade leve, moderada ou grave com o potencial de evoluir para a fatalidade. A evolução dos sintomas é usualmente rápida, atingindo o pico em 5-30 minutos e raramente pode perdurar por vários dias. Óbito pode ocorrer em minutos, mas raramente é descrito após dias ou semanas da reação anafilática inicial ¹⁰.

1.1.1. Principais doenças alérgicas IgE mediadas

As alergias IgE mediadas podem ser respiratórias que são a asma e a rinite, causadas pela interação de anticorpos IgE específicos com antígenos ambientais que geralmente são proteínas comuns como pólenes ou ácaros ^{2,11,12}. Embora quase metade dos pacientes com rinite alérgica tenham asma concomitante, uma frequência muito maior de pacientes com asma têm rinite alérgica concomitante ¹³. As manifestações clínicas incluem secreção de muco, tosse, espirros e dificuldade em respirar ^{2,11,12}.

Além das doenças respiratórias, a dermatite atópica pode também ser enquadrada como uma doença alérgica frequentemente observada. Trata-se de uma doença inflamatória de caráter crônico, recidivante, na qual o prurido e o ressecamento da pele são frequentes. É uma dermatose geralmente iniciada na infância e pode surgir em doentes com história familiar de asma, rinite alérgica e/ou dermatite atópica ¹⁴.

A alergia a venenos de himenópteros tem origem não atópica apesar de cerca de 30% dos pacientes alérgicos terem antecedentes de atopia ¹⁵. É uma doença alérgica clássica mediada por anticorpos do tipo IgE que se ligam à receptores na superfície de mastócitos e basófilos ¹⁶. Os mecanismos das reações alérgicas a himenópteros variam

de hipersensibilidade imediata a reações tardias e citotóxicas, mediadas por anticorpos e imunocomplexos, além de reações pseudo-alérgicas desencadeadas por desgranulação direta de mastócitos sem a participação de anticorpos mediadores ¹⁷. Aproximadamente 9,2 a 28,7% da população de adultos é sensibilizada a veneno de himenópteros ¹⁸.

1.2 Alergia Alimentar

A alergia alimentar é descrita como um efeito adverso para a saúde decorrente de uma resposta imune específica que ocorre de forma reprodutível após exposição a um determinado alimento ¹⁹, normalmente desencadeada por uma proteína nele presente. Em termos fisiológicos, trata-se de uma manifestação totalmente diferente da intolerância alimentar, que é uma reação não imune desencadeada por mecanismos tóxicos, farmacológicos ou metabólicos, embora existam também algumas vias ainda não completamente descritas que são desencadeadas quando a tolerância oral não se estabelece ²⁰.

O tecido linfóide associado ao intestino é a principal via pela qual estamos expostos a antígenos. No entanto, no caso de alergia alimentar, foram apresentadas provas que se relacionam com outras rotas que são as responsáveis pela sensibilização ao alérgeno. Pode ocorrer um processo de sensibilização anterior por uma via não oral, é possível que o contato de proteínas com células imunes por rotas diferentes do intestino possa estar implícito na falta de tolerância oral. As rotas sugeridas de exposição ao alérgeno são através do leite materno, por inalação, o primeiro contato pode até ocorrer através da placenta durante o desenvolvimento fetal. A via mais provável para sensibilização alérgica é a pele ^{21,22}.

A modificação térmica das proteínas é importante na alergia alimentar, pois pode causar mudanças estruturais como, perda de interações secundárias e ou terciárias formando novos rearranjos de ligação dissulfeto ou outras modificações conformacionais devido à desnaturação após o processo de cozimento, tornando-a mais ou menos alergênica ^{23,24}. No camarão sabe-se que após a cocção as proteínas de peso molecular mais alto são degradadas e tropomiosina, arginina quinase e proteína de ligação de cálcio sarcoplasmática se mantêm intacta além de apresentarem aumento de sua alergenicidade comparando-se com extratos crus ^{25,26}.

1.2.1. Diagnóstico e tratamento das alergias alimentares

Na avaliação diagnóstica das reações adversas a alimentos, a história clínica tem papel fundamental. O seu valor depende muito da capacidade recordatória dos sintomas pelos pacientes, e da habilidade do médico em diferenciar as manifestações causadas por hipersensibilidade alimentar daquelas relacionadas a outras condições ²⁷. A confirmação diagnóstica pode ser feita através de testes *in vivo* (testes cutâneos e provocação oral) e *in vitro* (IgE específica por ImmunoCAP ou ELISA)^{28,29}. Testes de provocação oral podem ser úteis dependendo da suspeita clínica necessitando ser realizada exclusivamente em ambiente hospitalar para maior segurança do paciente ³⁰.

Atualmente, na maioria das vezes a alergia alimentar é tratada com a retirada do alimento da dieta, que inclui uma atenção especial a leitura dos rótulos de produtos alimentares, cuidados no consumo de alimentos em restaurantes e no preparo dos mesmos ³¹. Outra opção incluem as terapias sintomáticas que não alteram a patogênese da alergia e envolvem o uso de medicamentos como anti-histamínicos ²⁹ e nos casos

graves de anafilaxia a aplicação de adrenalina intramuscular acompanhada pelo monitoramento do indivíduo ²⁸.

1.3 Alergia a frutos do mar

O mar tem sido uma importante fonte de alimento para populações humanas desde o início dos tempos. Os frutos do mar são uma fonte de proteína largamente consumida, devido a seu baixo valor calórico e alto teor nutricional ³².

Eles podem ser categorizados em três filos: Chordata, Mollusca e Arthropoda. O filo Chordata inclui os peixes que, em sua maioria, pertencem a classe dos Osteichthyes (salmão, atum, bacalhau, pescada). O filo Mollusca consiste em três classes: gastrópodes (caracóis e abalone), bivalves (vieiras, moluscos, mexilhões, ostras) e cefalópodes (lula, polvo). E o filo Arthropoda inclui o subfilo dos crustáceos, que engloba camarão, caranguejo e lagosta ³³.

Reações adversas a frutos do mar podem ser mediadas por mecanismos imunológicos e não imunológicos, através da exposição ao próprio fruto do mar ou a outro componente presente no momento da ingestão. Estes componentes podem incluir parasitas (*Anisakis simplex*), protocordados (Hoya), bactérias (*Vibrio*, *Klebsiella*, e *Pseudomonas*), vírus (hepatite A), toxinas (saxitoxina e ciguatera), aminas biogênicas, e conservantes flavorizantes ou corantes (benzoato de sódio ou metabissulfitos) ³².

Até o momento a restrição alimentar é o único tratamento disponível para reações alérgicas a frutos do mar. Os testes de provocação oral duplo cego placebo-controlados são particularmente úteis para fornecer condutas definitivas aos pacientes em relação à

restrição de alimentos. No entanto, estes testes são demorados, onerosos e podem induzir sintomas clínicos potencialmente graves. Portanto, seria vantajoso ter métodos diagnósticos confiáveis que tornariam desnecessários os desafios orais.

Nos últimos 20 anos, diversos alérgenos foram identificados em frutos do mar ³⁴. Eles são a causa mais comum de alergia alimentar e estão entre as causas que ocasionam reações mais graves em todo o mundo ³², visto que provocam uma resposta alérgica exacerbada podendo desencadear anafilaxia ³¹. Em ordem decrescente, os frutos do mar mais alergênicos são: camarão, caranguejo, lagosta, moluscos, ostras e mexilhões ³³.

No mundo inteiro, cerca de 300 espécies de camarão são de interesse econômico. Destes, aproximadamente 100 espécies compõem as principais capturas sendo o camarão *Acetes japonicus* a mais importante espécie em volume no mundo ³⁵ e o camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), que está entre as 10 espécies de camarão mais capturadas em volume no mundo ^{36,37}.

Alguns alérgenos já foram descritos para camarão. A tropomiosina tem peso molecular entre 38 e 41 kDa ³² e é considerada responsável pela maior parte das reações alérgicas ao camarão ⁴⁰ já que pelo menos 80% dos pacientes alérgicos ao camarão reagem a esta proteína ⁴¹. Um estudo de 2010 aponta a tropomiosina como ferramenta diagnóstica importante, sendo positiva em 83% dos pacientes alérgicos, mas também em 44% dos pacientes tolerantes ⁴². Para o diagnóstico de alergia a camarão encontra-se disponível o ImmunoCAP para extrato total de camarão, bem como para tropomiosina isolada.

Outra proteína considerada um alérgeno *major* para camarão é a arginina quinase. Assim como a tropomiosina, é altamente abundante no músculo liso porém apresenta propriedades físico-químicas instáveis e não é resistente ao calor ou a tratamentos à base de ácidos ³⁹. Apresenta peso molecular entre 40-45 kDa e é também considerada um panalergeno, sendo encontrada em alguns invertebrados como a mariposa, barata e lagosta ⁴³. Além desses dois alérgenos há outros já descritos como mostrado (tabela 1), mas ainda nenhum destes foi identificado para a espécie *X. kroyeri*.

Tabela 1 Alérgenos identificados em diferentes espécies de camarão

Espécie	Alérgeno	Proteína	Massa molecular	Resistente ao calor	Reconhecido pela IUIS
<i>Artemia franciscana</i> (Camarão salmoura)	Art fr 5	Cadeia leve de Miosina 1	~ 17.5 kDa	Sim	Sim
<i>Crangon crangon</i> (Camarão do mar do norte)	Crac c 1	Tropomiosina	~ 38 kDa	Sim	Sim
	Crac c 2	Arginina quinase	~ 45 kDa	Não	Sim
	Crac c 4	Proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático	~ 25 kDa	Sim	Sim
	Crac c 5	Cadeia leve de Miosina 1	~ 17.5 kDa	Sim	Sim
	Crac c 6	Troponina C	~ 21 kDa	Sim	Sim
	Crac c 8	Triosefosfato isomerase	~ 28 kDa	Não	Sim
<i>Litopenaeus vannamei</i> (Camarão branco)	Lit v 1	Tropomiosina	36 kDa	Sim	Sim
	Lit v 2	Arginina quinase	~ 40 kDa	Não	Sim
	Lit v 3	Cadeia Leve de Miosina 2	20 kDa	Sim	Sim
	Lit v 4	Proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático	20 kDa	Sim	Sim
	Lit v PK	Piruvato quinase	64 kDa	_____	Não
	Lit v Trx	Tioredoxina	12 kDa	_____	Não
<i>Metapenaeus sensis</i>	Met e 1	Tropomiosina	N.A	Sim	Sim
<i>Pandalus borealis</i> (Camarão do norte)	Pan b 1	Tropomiosina	37 kDa	Sim	Sim
	Pan b Myosin	Cadeia Pesada de Miosina	200-225 kDa	_____	Não
<i>Penaeus aztecus</i> (Camarão marrom)	Pen a 1	Tropomiosina	36 kDa	Sim	Sim
<i>Penaeus indicus</i>	Pen I 1	Tropomiosina	34 kDa	Sim	Sim
<i>Penaeus monodon</i> (Camarão tigre negro)	Pen m 1	Tropomiosina	38 kDa	Sim	Sim
	Pen m 2	Arginina quinase	40 kDa	Não	Sim
	Pen m 3	Cadeia Leve de Miosina 2	19 kDa	Sim	Sim
	Pen m 4	Proteína de ligação ao cálcio sarcoplasmático	22 kDa	Sim	Sim
	Pen m 6	Troponina C	17 kDa	Sim	Sim
	Pen m Enolase	Enolase	47 kDa	_____	Não
<i>Solenocera melanthero</i>	Sol me Actinin	Actinina	94 kDa	_____	Não
	Sol me FPA	Aldolase	43 kDa	_____	Não
	Sol me alpha_actin	Alfa actina	46 kDa	_____	Não
<i>Sergia lucens</i>	Ser lu1	Tropomiosina		Sim	Não
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Mac r Hemocyanin	Hemocianina	90 kDa	Sim	Não

Fonte: 39,44,45

1.4.1. *Xiphopenaeus kroyeri*

O gênero *Xiphopenaeus* é representado no Brasil por uma única espécie, *Xiphopenaeus kroyeri* (Figura 1), comercialmente denominada por camarão sete- barbas⁴⁶. A espécie ocorre na costa americana do Pacífico (México ao Peru) e tem ampla distribuição no Atlântico Ocidental (da Carolina do Norte, Estados Unidos, ao Rio Grande do Sul, Brasil). No Brasil, tem ocorrência registrada em todos os estados, desde o Amapá até o Rio Grande do Sul, sendo que neste último apenas com frequência ocasional⁴⁷.

Figura 1 Camarão *Xiphopenaeus kroyeri*– Extraído de: IBAMA, (2011)⁴⁶

Os dados populacionais disponíveis sobre *X. kroyeri* referem-se à espécie como sendo a única do gênero no Brasil, embora existam evidências de que se tratam de duas espécies crípticas, ou seja, com alta similaridade morfológica, porém geneticamente diferentes, possuindo ainda subpopulações distintas ao longo da costa brasileira⁴⁷.

1.4 Reatividade cruzada

Há muitos anos se sabe que alimentos pertencentes a um mesmo grupo ou família podem reagir de forma cruzada, mas esse fenômeno também pode ocorrer entre alimentos e substâncias aparentemente não relacionadas ⁴⁸.

A reatividade cruzada imunológica não traduz, necessariamente, a existência de reatividade clínica e as sensibilizações assintomáticas a alimentos são relativamente frequentes ^{49,50}.

No camarão a tropomiosina é a principal proteína alergênica e por se fazer presente em outros crustáceos, moluscos e em outros artrópodes como ácaros e baratas o que a torna um panalérgeno ³⁸⁻⁴⁰. A tropomiosina é uma proteína conhecida por ser um importante alérgeno e potente sensibilizador não apenas pela via inalatória, mas também quando ingerida. Foi identificada em alérgenos inalantes, como ácaros e baratas, e igualmente em alérgenos alimentares, como camarão, lagosta, caranguejo e outros, sendo responsável por reatividade cruzada entre moluscos e crustáceos, encontrando-se presente também em parasitas, como *Anisakis simplex* e *Schistosoma* ⁵¹.

Dentre as tropomiosinas de invertebrados, a homologia de suas sequências pode ser superior a 80%, assim como observado quando comparamos a homologia de sequências entre as tropomiosinas do grupo de vertebrados. Quando comparamos a sequência de vertebrados e invertebrados, a homologia chega a ser de até 58%. Isto poderia explicar a reatividade cruzada IgE mediada observada em algumas ocasiões entre tropomiosinas de alérgenos inalantes (ácaros e baratas) com tropomiosinas caracterizadas como alérgenos alimentares (camarão, lagosta) ³⁹.

1.5 Alergologia molecular e Medicina de precisão

A idéia de tratamentos individualizados e adaptados às características específicas da doença de cada indivíduo não é um novo conceito na prática da alergologia e alergologia clínica. Esta noção teve sua fundamentação científica com a descrição de um protocolo de Noon e Freeman para imunizar pacientes afetados com rinite alérgica induzida por pólen de gramíneas com um extrato de pólen destas gramíneas para reduzir a sua reatividade clínica a um alérgeno específico ⁵². De fato, o diagnóstico preciso é fundamental para a seleção do melhor tratamento em todas as áreas da medicina ^{52,53}.

Consequentemente, identificar primeiro o alérgeno além de outros fatores que conduzem a doença em indivíduos alérgicos de forma individual antes de definir o tratamento mais adequado representa um dos melhores exemplos da importância crítica deste princípio geral ⁵⁴.

As variações observadas na resposta ao tratamento em indivíduos com características clínicas semelhantes (denominadas fenótipos) reforçam o conceito de que, "um único tratamento não se adequa a todos" e encorajam a comunidade científica a determinar mecanismos fisiopatológicos específicos. Para este fim, a classificação de fenótipos de doença em subclasses denominadas endótipos, isto é, a identificação de características definidas por mecanismos específicos, leva em consideração as variações associadas nas vias genéticas, farmacológicas, fisiológicas, biológicas e imunológicas com cada fenótipo. O tratamento dirigido a um indivíduo com base no perfil endotípico, em vez de no perfil fenotípico, passou a ser denominado por consenso como medicina de precisão ou personalizada ^{54,55}.

Em alergia alimentar há uma diversidade de apresentações clínicas, o que representa um desafio para o gerenciamento de um tratamento bem-sucedido, portanto a medicina

de precisão é altamente relevante para melhorar a prevenção e terapia desses indivíduos alérgicos. Avanços tecnológicos e novos estudos sobre mecanismos moleculares subjacentes em alergia alimentar nos fornecem novas informações para poder classificar melhor seus fenótipos e endótipos. Os biomarcadores sensíveis e específicos para a determinação dos endótipos de alergia alimentar, o risco de desenvolver alergias, a gravidade da reação e o prognóstico com o tratamento são componentes essenciais no caminho da medicina de precisão ⁵⁶.

Desde a descoberta da IgE e a criação de testes específicos *in vitro* para a determinação de alérgenos IgE específicos essa imunoglobulina juntamente com uma história clínica precisa de alergia têm sido pedras angulares nos campos de pesquisa de alergia e diagnóstico clínico⁵⁷. Durante as últimas décadas, não apenas a caracterização e padronização de extratos de alérgenos melhoraram, mas também a gama de fontes de alérgenos aumentou. Paralelamente, os desenvolvimentos na tecnologia de ensaios melhoraram os aspectos laboratoriais, como a automação e a taxa de transferência de amostras. No entanto, a contribuição mais importante para o campo do diagnóstico de alergia tem sido a introdução de moléculas ou componentes alergênicos. Eles abriram um novo horizonte na pesquisa de alergias. Com relação ao desempenho, os ensaios de ImmunoCAP com extratos de alérgenos são boas ferramentas de triagem, mas as moléculas alergênicas dissecam a resposta de IgE em um nível molecular e colocam a pesquisa de alergia no mapa da medicina de precisão⁵⁷.

2. JUSTIFICATIVA

- Alergia a camarão é a alergia alimentar mais prevalente entre adultos no mundo⁵⁸, alguns alérgenos já foram descritos para diferentes espécies de camarão, mas nenhum para a espécie *X. kroyeri*, e sua importância se dá por essa espécie ser bastante consumida em nosso país.
- Ocorre uma falta de sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos disponíveis para alergia a camarão.
- Trabalhos na literatura sugerem que existam mais alérgenos no camarão do que as moléculas identificadas até o momento.
- Alguns indivíduos relatam sintomas clínicos apenas após consumir camarão com casca.

3. OBJETIVOS

Geral

- Verificar a presença de proteínas IgE-reativas para camarão *X. kroyeri* em indivíduos com diagnóstico confirmado de alergia a camarão.

Específicos

- Avaliar *in vitro* a resposta IgE-mediada a proteínas presentes na casca e na carne do camarão *X. kroyeri*;
- Identificar alérgenos presentes na casca e na carne do camarão *X. kroyeri*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação ética

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa- CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- HCFMUSP (CAAE: 67399317.6.0000.0068). Os indivíduos incluídos neste estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente no estudo “Valor da determinação de IgE específica para tropomiosina no diagnóstico da alergia ao camarão” (protocolo de pesquisa: 0351/10).

4.2. Recrutamento dos indivíduos

Todos os indivíduos selecionados para este estudo são participantes do protocolo de pesquisa intitulado: “Valor da determinação de IgE específica para tropomiosina no diagnóstico da alergia ao camarão” (protocolo de pesquisa: 0351/10), conduzido pela Dr^a Paula Meireles no ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP, durante seu mestrado sob supervisão do Prof. Dr Fábio Castro. A partir deste estudo prévio selecionamos indivíduos com alergia confirmada a camarão conforme os critérios de inclusão:

- História prévia compatível com alergia,
- Teste cutâneo de leitura imediata (TCLI),
- IgE sérica específica para crustáceo e teste de provocação oral (TPO).

Não foi realizado TPO em indivíduos que reportaram anafilaxia num período inferior a 1 ano. Os soros desses indivíduos encontravam-se armazenados em freezer a -20°C incluindo os soros controle que foram utilizados para realização dos experimentos *in vitro*. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 2, e os dados demográficos encontram-se na tabela 3.

Tabela 2 Testes confirmatórios realizados nos indivíduos alérgicos a camarão e seus sintomas clínicos e resultados de ImmunoCAP dos não alérgicos.

Pacientes	Sintomas clínicos	TCLI <i>X. kroyeri</i> (cru)	TCLI <i>X. kroyeri</i> (cozido)	TCLI Extrato comercial	IgE Camarão (f24)	IgE Tropomiosina (f351)	TPO
1	Inalatório (ao fritar em casa): Dispnéia. Ingestão: sensação de grosseiro na língua, dispnéia e obstrução nasal. Contato: angioedema, urticária e dispnéia.	7x7	7x5	6x6	1,77	0,04	Dispensado
2	Angioedema nos olhos (bilateral) e lábios. AO TPO negativo DC aberta positiva 5 horas após. Edema nos pés (bilateral), prurido ocular e urticas.	11x6	15x6	12x5	25,6	25,8	POS
3	Rouquidão, aperto em orofaringe, disfonia, tosse e angioedema nas pálpebras. Ao TPO prurido em orofaringe e angioedema em lábio superior.	11x5	7x6	10x7	3,66	4,72	POS
4	Anafilaxia grau IV (cianose - IOT/UTI). Início aos 28 anos edema face e urticas. Aos 32 anos: prurido orofaringe e edema palpebral. 47 anos	20x10	16x11	9x6	2,15	6,37	POS

	sincope						
5	Anafilaxia grau IV. Angioedema labial, urticária, perda de consciência e liberação de urina. Primeira reação aos 10 anos, após comer camarão frito com casca, com prurido cutâneo e urticas.	NEG	8,9	10x4	16,5	37,2	POS
6	Sintomas aos 4 anos de idade após ingestão, (prurido e edema em face). Em 2013 ao entrar em restaurante japonês, prurido em orofaringe, congestão nasal e espirros.	15x9	20x5	7x5	21,6	19,1	Dispensado
7	Prurido orofaringe, braços e pernas, rash. Em TPO aberto: epigastralgia, prurido em língua e urticas em face.	34x7	7x4	11x6	0,69	0,56	POS
8	Broncoespasmo, urticária e angioedema na face. Espirros, obstrução nasal, hiperemia conjuntival e edema em palato.	6x4	10x7	8x7	0,06	0,01	POS
9	Prurido orofaringe, edema labial, urticas e dispneia. Tosse e hiperemia conjuntival.	10x6	17x7	17x5	1,1	1,13	POS
10	Diarreia, prurido e urticária, vômito, edema mão.	3x3	NEG	6x5	0,02	0,01	Dispensado
11	Prurido em lábios, olhos, couro cabeludo, náuseas, urticária. Reagiu ao teste cutâneo com prurido ocular e nasal, rinorreia e obstrução nasal. 17 minutos de teste	18x11	14x8	9x7	1,01	1,76	Dispensado

	cutâneo iniciou reação.						
12	Prurido em orofaringe e lábios. Edema labial.	15x6	11x6	11x8	0,6	0,02	POS
13	Urticaria angioedema, tosse e dispneia. Hipotensão.	7x6	11x4	9x7	0,19	0,02	POS
14	Dormência nas mãos, lábios e boca com ingestão, rash e vômitos.	NEG	NEG	4x4	0,08	0,03	POS
15	Prurido cutâneo urtica edema labial. Prurido em olhos, orofaringe. Ao manipular, edema em mãos e prurido.	NEG	NEG	NEG	0,08	0,02	POS
16	Edema em face, dispneia e dificuldade na fala. Cólica, urticas e mal estar, vômitos.	8x6	7x6	12x6	16,0	29,3	Dispensado
17	Urticária e angioedema periorbital. Eritema em face. Contato inalatório prurido em orofaringe, rinorréia, prurido ocular e eritema em face.	14x15	9x10	14x7	14,14	12,0	Dispensado
18	Início aos 20 anos, sintomas: sentir raspar a garganta após 5 min de consumo camarão. Aos 32 comeu camarão com outros peixes/crustáceos e não apresentou reação. Aos 32 comeu camarão frito com casca após 20 min apresentou angioedema periorbitário, nega urticária e outros sintomas respiratórios.	13x10	4x3	NR	3,40	0,93	NR
19	-----	NR	NR	NR	0,01	0	-----
20	-----	NR	NR	NR	0	0,005	-----
21	-----	NR	NR	NR	0,31	0,01	-----

22	-----	NR	NR	NR	0	0	-----
23	-----	NR	NR	NR	0	0	-----
24	-----	NR	NR	NR	0,01	0	-----
25	-----	NR	NR	NR	0,23	0	-----
26	-----	NR	NR	NR	0,07	0	-----
27	-----	NR	NR	NR	0,01	0,004	-----

*TCLI Realizado com *X. kroyeri* sem casca

ImmunoCAP considerado positivo quando > 0,35 kUA /l

TCLI considerado positivo quando > 3x3mm

Dispensado: reportou anafilaxia em < 1 ano

POS- Positivo **NEG-** Negativo **NR-** Não Realizado

Tabela 3 Dados demográficos dos indivíduos selecionados para o estudo

	Indivíduos	Idade	Gênero
	1	51	F
Alérgicos	2	43	M
	3	45	F
	4	48	F
	5	54	F
	6	13	F
	7	38	F
	8	54	F
	9	30	F
	10	14	F
	11	25	M
	12	29	M
	13	30	F
	14	29	F
	15	49	F
	16	40	F
	17	15	F
	18	33	M
Não alérgicos	19	32	M
	20	37	F
	21	33	F
	22	36	F
	23	30	F
	24	22	M
	25	21	F
	26	25	M
	27	27	F

4.3. Pesquisa de IgE específica in vitro (ImmunoCAP)

Serão realizados testes de ImmunoCAP para camarão (f24) e para tropomiosina de camarão (f351) para todos os indivíduos do estudo. O ensaio é realizado de forma automatizada em um equipamento (Phadia 100), dedicado à rotina clínica e alocado no Laboratório de Investigação Médica FMUSP- LIM-60.

Princípio do Método: FEIA – FLUOROENZIMAIMUNOENSAIO

O alérgeno do qual se suspeita de alergia encontra-se acoplado por ligação covalente à fase sólida ImmunoCAP (polímero). Ele reage com anticorpos IgE específicos contidos na amostra de soro do paciente. Após os anticorpos não-específicos terem sido eliminados através de lavagem, é adicionado o Conjugado, anticorpos anti-IgE ligados a enzima (β -galactosidade). Após a incubação, os anticorpos não ligados são eliminados através de lavagem.

O substrato da enzima, contido na solução reveladora (Development), é adicionado ao meio reacional e então aguarda-se um período de incubação. Em seguida a reação é interrompida pela adição de solução Stop e a fluorescência do eluato é medida.

Quanto mais elevado for o valor de fluorescência, mais elevada é a quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra. Para se quantificar essa amostra, os resultados de fluorescência (resp) medidos em unidades de resposta (RU) são comparados com a curva de calibração armazenada no equipamento.

4.4. Extração proteica da carne e da casca do camarão

O camarão utilizado neste estudo foi coletado na Praia de Perequê, município de Guarujá- litoral de São Paulo, sem adição de nenhum tipo de conservante e armazenado em freezer -20 °C até o momento da extração proteica. Foram realizadas duas coletas, sendo uma em Janeiro e outra em Junho de 2017.

Primeiramente, a carne do camarão foi separada da casca e ambos foram cozidos em microondas por aproximadamente 1 minuto antes da preparação do extrato, exatamente como feito no projeto anterior onde foram realizados o TCLI e TPO de onde foram selecionados os indivíduos para o presente estudo. A extração de proteínas foi feita a partir de 2g de da carne do camarão e casca do camarão. Primeiramente fizemos uma tentativa de extração em PBS sob agitação por 36 horas, seguidos de centrifugação e filtração. Este método não foi suficiente para extrair proteínas suficientes para os experimentos subsequentes. Sendo assim, o protocolo utilizado foi de acordo com o procedimento descrito por Carpentier *et al.*(2005)⁵⁹ com algumas adaptações.

Ambos foram maceradas com Tampão de extração 1 (50 mM de Tris-HCl ph 8,5 + 5 mM de EDTA + 100 mM de KCl + 1 % de DTT + 30 % de sacarose), misturado com um coquetel contendo inibidor de protease (P9599 Sigma-Aldrich-Missouri, EUA) e inibidores de fosfatase (P5726 e P0044 Sigma-Aldrich-Missouri, EUA). Essa mistura ficou sob agitação por 30 segundos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado volume igual de fenol e a amostra foi mantida sob agitação por 15 minutos a 4 °C e centrifugada a 3220 rcf por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e para a precipitação das proteínas foi utilizado acetato de amônio 100mM em metanol a - 20 °C por 12 horas.

Após precipitação seguiram-se as seguintes etapas: centrifugação a 3220 rcf por 30 minutos a 4 °C; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com acetato de amônio 100 mM em metanol por 1 hora a -20 °C; centrifugação a 3220 rcf por 30 minutos a 4 °C; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com acetona gelada por 1 hora a -20 °C; centrifugação 3220 rcf por 30 minutos a 4 °C; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* secou ao ar livre por aproximadamente 30 minutos; depois de seco, o *pellet* foi então ressuscitado em Tampão de extração 2 (7 M de uréia + 2 M tiouréia + 4 % CHAPS + 1 % DTT).

A dosagem de proteínas totais do extrato foi realizada pelo método de Bradford. O extrato de proteínas totais da carne e da casca do camarão foi conservado a -20 °C até o momento da sua utilização.

4.5. Eletroforese 1D e 2D

Para os ensaios de eletroforese 1D e 2D foram utilizados os extratos de carne e casca do camarão *X. kroyeri* produzidos em nosso laboratório das duas coletas separadas para o gel 1D e os extratos foram misturados para o gel 2D.

A separação inicial das proteínas do extrato bruto foi realizada por eletroforese 1D em gel de poliacrilamida 10 %.

As amostras foram previamente aquecidas a 95 °C na presença de SDS e de um reagente thiol (2-mercaptoetanol), para desnaturação e quebra das pontes dissulfeto. A corrente aplicada foi de 10 mA/gel durante 15 minutos (ou até a entrada da amostra no gel de resolução) e de 35 mA/gel até o fim da corrida.

Cerca de 20 µg de proteínas totais foram aplicadas em cada poço do gel.

Primeira dimensão – Focalização isoeétrica (IEF): Para realização da IEF as proteínas foram solubilizadas em uma solução de reidratação (*DeStreak* acrescido de 0,5 % de tampão IPG (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia) e azul de bromofenol. As fitas para imobilização de proteínas (*Immobiline Dry Strips* - IPG) foram reidratadas nesta solução de proteínas por aproximadamente 15 horas e submetidas ao IEF em um sistema IPGphor (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia) a 500 Vh, 1000 Vh e 8000 Vh.

Segunda dimensão – SDS-PAGE: Após a primeira dimensão as fitas de IPG foram incubadas em Tampão de equilíbrio 1 (75 mM Tris-HCl, pH 8.8; uréia 6 M; 30 % de glicerol; 10 mg/mL DTT; 2 % SDS; iodoacetamida e azul de bromofenol), durante 15 minutos para a redução das pontes dissulfeto e por mais 15 minutos em Tampão de equilíbrio 2 (mesma solução, entretanto substituindo-se DTT por 25 mg/mL de iodoacetamida) para alquilação destas pontes. As fitas foram então transferidas para os géis 10 % de poliacrilamida contendo SDS que após a corrida foram corados com *Commassie Blue Coloidal* (49). As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

4.6. Western Blotting

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas do gel para membranas de nitrocelulose em um sistema de eletrotransferência *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-rad Califórnia, USA); os géis que passaram pelo processo de segunda dimensão foram transferidos para membrana de nitrocelulose a 4 °C por 1 hora, a 100 V e 400 mA, de acordo com Towbin *et al.*⁶⁰, em cuba de eletrotransferência *miniVE Vertical Electrophoresis System* (Amersham Pharmacia Biotech)

Nos ensaios de *Western Blotting* (WB) para detecção de IgE específicas à proteínas da carne e casca do camarão, foram utilizados soros de indivíduos com alergia a camarão com diagnóstico confirmado no ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP. O anticorpo utilizado foi Anti-IgE humano produzido em camundongos (ϵ -específica) e conjugado à *Horseradish Peroxidase* (HRP) (Invitrogen-Califórnia, EUA).

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-Tween 20 a 0,1 % (v/v) e leite em pó desnatado 5 % (m/v) por 1 hora, em temperatura ambiente. Os soros dos indivíduos foram solubilizados em TBS-Tween 20 a 0,1 % (v/v) e leite em pó desnatado 5 % (m/v), diluídos na proporção 1:5. A membrana foi incubada com o soro dos indivíduos a 4 °C por 16 horas sob leve agitação. Após essa etapa, a membrana foi lavada com TBS-Tween 20 0,1 % (v/v) por 3 vezes, durante 10 minutos cada lavagem em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgE) diluído em TBS-Tween 20 a 0,1 % (v/v) na proporção 1:5000 por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 3 vezes com TBS-Tween 20 a 0,1 % (v/v) durante 10 minutos em temperatura ambiente. Para detecção por quimioluminescência foi utilizado o *Kit* de Imunofluorescência Aumentada “*Enhanced Chemi Luminescence*” (ECL) (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suécia), segundo recomendações do fabricante. As membranas foram reveladas utilizando o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

4.7. Identificação das proteínas

4.7.1. Digestão *in gel* para *spots* excisados do gel 2D

Os *spots* selecionados a partir dos resultados do WB 2D foram recortados manualmente e submetidos à digestão e extração dos fragmentos tripsínicos gerados.

Após a visualização dos géis 2D, os *spots* foram excisados manualmente em capela de fluxo laminar vertical e colocados em microtubos siliconizados de 500 µL para subsequente digestão *in gel* e extração dos fragmentos tripticos. A digestão *in gel* e a extração dos fragmentos tripticos foram realizados segundo protocolo modificado de Shevchenko e colaboradores (1996)⁶¹.

A enzima utilizada foi a Tripsina modificada da Promega (Madison, WI, EUA). Todos os demais reagentes, incluindo bicarbonato de amônio e acetronitrila são Aldrich (Milwaukee, WI, EUA).

Os pedaços excisados de gel foram descoloridos com 250 µL de solução de *Destain* (10 % ácido acético; 50 % metanol) por 16 horas. Após, para desidratação dos fragmentos de gel foi realizada 2 vezes adicionando-se 200 µL de acetoneitrila 100 % por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se a secagem dos *spots* em temperatura ambiente por 15 minutos. Para redução, foram adicionados aos *spots* 30 µL de solução de DTT 10 mM e estes foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Para alquilação, foram adicionados 30 µL da solução de Iodoacetamida 50 mM seguindo-se incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os *spots* foram lavados com 100 µL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos. A etapa de desidratação foi repetida e posteriormente os *spots* foram reidratados com 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos. Novamente os fragmentos de gel foram desidratados e em seguida foram adicionados 30 µL de solução de tripsina (concentração final da

tripsina 20 ng/ μ L) e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM com posterior incubação a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte para extração, foram adicionados 10 μ L da solução de extração 1 (ácido fórmico 5 % em água purificada) seguindo-se incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 12 μ L da solução de extração 2 (ácido fórmico 5 % em acetonitrila 50 %) com incubação por 10 minutos em temperatura ambiente por duas vezes. Os sobrenadantes das últimas 3 etapas foram coletados em um único tubo siliconizado de 1,5 mL e as amostras foram liofilizadas até o volume ser reduzido a aproximadamente 0,5 μ L em Speedvac SC110 (Thermo Savant, Milford, MA, EUA).

4.7.2. Identificação das proteínas por espectrometria de massas

As amostras contendo os fragmentos tripsínicos gerados foram enviadas para identificação para o CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos) da UNESP campus Botucatu - Laboratório sob supervisão da Dra. Lucilene Delazari dos Santos. O *pool* de peptídeos advindos da digestão tripsínica foi analisado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um equipamento de espectrometria de massas do tipo electrospray/quadropolo (ESI-Q) modelo MicroQ-TOF III (Bruker Daltonics), acoplado à um cromatógrafo líquido LC-20AT (Shimadzu). O cromatógrafo líquido acoplado ao equipamento de espectrometria de massas é composto por um sistema binário de bombas e um aplicador de amostras automático. A separação cromatográfica foi realizada por meio de uma coluna de fase reversa C18 (4,5 mm x 100 mm, 1,8 μ m), utilizando como fase móvel Água 100% [v/v] (tampão A) e

Acetonitrila 100% [v/v] (tampão B), ambos contendo ácido fórmico 0,1% (v/v). As condições de eluição foram otimizadas num gradiente linear de 0 à 40% do tampão B por 45 minutos sob fluxo de 0,2 mL/min. A coluna e o aplicador automático de amostras foram mantidos à 25°C e 10°C, respectivamente. O equipamento de espectrometria de massas é equipado com uma bomba de injeção de amostras automática (KD Scientific), da qual a solução calibrante Esi- Low Concentration Tuning Mix (Agilent) foi injetado previamente antes de cada amostra/análise. O espectrômetro de massas atuou com 4.5 kV com temperatura de solvatação de 180°C, modo positivo em um intervalo de ionização entre 100 m/z a 2500 m/z, fluxo de nitrogênio de 6 L/min e pressão de 0.8 bar. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila ácido fórmico 0,1% (v/v) e foram injetadas usando um fluxo constante de 0,3 mL/min. Para as análises de MS/MS foi utilizada o gás nitrogênio como gás de colisão. A energia de colisão que foi utilizada foi de 200 eV. O equipamento ESI-Q-ToF foi calibrado no intervalo de 50 a 3000 m/z, utilizando calibrantes internos, sendo que a calibração externa foi realizada na presença de formiato de sódio. Os dados foram processados pelo software Bruker Data Analysis (versão 3.3).

4.7.3. Análise dos dados

Após as aquisições dos resultados de espectrometria de massas de cada amostra, os dados foram exportados no format *mascot generic* (mgf) e submetidos à análise automática com a ferramenta de bioinformática MASCOT. O servidor MASCOT v.2.1 (www.matrixscience.com) foi utilizado como ferramenta de bioinformática para auxiliar na identificação das proteínas do presente trabalho. Os espectros dos peptídeos e das fragmentações obtido experimentalmente foram confrontados com o conjunto de

sequências de peptídeos alocada no banco de dados SwissProt e Decapoda do NCBI. Para aumentar a precisão na determinação das proteínas, foram utilizados os seguintes parâmetros: Enzima: Tripsina como agente de clivagem; Taxonomia: *all taxa*s; Carbamidometilação (cisteína) como modificação fixa; Oxidação (metionina) como modificação variável; No de clivagens perdidas pela enzima: 1; Massa molecular do tipo: Monoisotópica; Massa molecular: sem restrições; Erro de tolerância de peptídeos $\pm 0,1$ Da e erro de tolerância de MS/MS $\pm 0,1$ Da para análise de MS/MS; Protonação: +1 ou +1,+2, +3 para o estado da carga dos peptídeos; Tipo de instrumento: ESI-Q-ToF.

4.8. Análise estatística

O valor dos testes para diagnóstico de alergia ao camarão foi analisado através dos conceitos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência. Sensibilidade foi definida como a proporção de testes verdadeiros positivos em relação ao total de alérgicos ao camarão, especificidade foi definida como proporção de testes verdadeiros negativos em relação ao total de não alérgicos ao camarão. O valor preditivo positivo refere-se à probabilidade do indivíduo ser alérgico a camarão, dado que o teste é positivo, assim calculou-se o VPP como a proporção de alérgicos com teste positivo em relação ao total de testes positivos para camarão. O valor preditivo negativo refere-se a probabilidade do indivíduo não ser alérgico a camarão, dado que o teste é negativo, assim calculou-se o VPN como a proporção de não alérgicos com teste negativo em relação ao total de testes negativos para camarão. Eficiência é definida como a proporção de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos detectados entre o número total de testes.

5. RESULTADOS

O método escolhido para obtenção de um extrato proteico da casca e carne do camarão com rendimento suficiente para realização das etapas subsequentes foi a extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol. Foi testado também o método de extração em PBS (Tampão fosfato salino) onde ambas as amostras foram maceradas e deixadas sob agitação por aproximadamente 16 horas, porém a quantificação proteica foi inferior em comparação ao método selecionado.

Foram obtidos extratos de 29,9µg/µl para carne de camarão e 23,8µg/µl para casca de camarão a partir de uma amostra de camarão pescada em janeiro de 2017 e extratos de 34µg/µl de carne de camarão e 30,5µg/µl de casca de camarão a partir de uma amostra de camarão pescada em junho de 2017. Ambos extratos foram submetidos a uma eletroforese 1D em gel de poliacrilamida 10% para visualização de todas as bandas proteicas presentes. Os resultados mostram que ocorre variação na composição do extrato proteico preparado em diferentes épocas do ano (Figura 2). Diante disso os outros experimentos foram realizados com a mistura dos dois extratos.

Figura 2 Eletroforese 1D dos extratos de *X. kroyeri* pescados em Janeiro (A) e Junho (B) de 2017. A regiões destacadas evidenciam as diferenças entre eles. Marcador molecular (MM), extratos da carne do camarão (CM) e da casca (CS) respectivamente em gel SDS 10%.

Com base na história clínica, foram selecionados 18 indivíduos, alérgicos a camarão, com história clínica compatível com alergia ao crustáceo, confirmada por TCLI, TPO ou ImmunoCAP para camarão e tropomiosina (tabela 2). Um total de 9 indivíduos não alérgicos a camarão foram também selecionados para compor um grupo controle. Dos 18 indivíduos alérgicos 77,7% (14/18) eram do sexo feminino e 22,2 % (4/18) eram do sexo masculino com uma faixa etária média e mediana de 35,5 anos. Dos 9 indivíduos não alérgicos 66,6% (6/9) eram do sexo feminino e 33,3% (3/9) eram do sexo masculino com faixa etária média de 29,4 anos e mediana de 30 (tabela 3).

Considerando os resultados obtidos nos testes *in vitro* para detecção de IgE específica (ImmunoCAP) agrupamos os indivíduos participantes como mostra a Figura 3. Cinco indivíduos com alergia comprovada a camarão apresentaram testes *in vitro*

negativos tanto para camarão quanto para tropomiosina no ImmunoCAP, e dois apresentam positividade para camarão, mas são negativos para tropomiosina.

Figura 3 Agrupamento dos indivíduos alérgicos incluídos no estudo com base nos resultados de ImmunoCAP.

Foi realizado um WB 1D com um *pool* de soros de todos os indivíduos alérgicos e não alérgicos para visualização e comparação de reatividade IgE entre carne e casca de camarão nos dois grupos. Foram observadas quatro regiões onde houve diferença no reconhecimento de IgE entre carne e casca, nas regiões de 27, 45, 65 e 90 kDa como mostra a figura 4.

Figura 4 Western Blotting 1D com pool soro de todos os indivíduos alérgicos e não alérgicos frente proteínas de carne e casca de camarão. As regiões destacadas indicam diferença de reconhecimento entre carne e casca. Marcador de massa molecular (MM), camarão (CM) e casca (CS).

Para verificar se haveria diferença de reconhecimento entre carne e casca e melhor visualizar o reconhecimento IgE específico individual foram feitos WB 1D para todos os indivíduos incluídos no estudo para os extratos de carne e casca. Considerando os resultados obtidos nos testes *in vitro* para detecção de IgE específica (ImmunoCAP) agrupamos os indivíduos participantes como mostra a Figura 3. Cinco indivíduos com alergia comprovada a camarão apresentaram testes *in vitro* negativos tanto para camarão quanto para tropomiosina no ImmunoCAP, e dois apresentam positividade para camarão, mas são negativos para tropomiosina.

Para verificar se haveria diferença de reconhecimento entre carne e casca e melhor visualizar o reconhecimento IgE específico individual foram feitos WB 1D para todos os indivíduos incluídos no estudo para os extratos de carne e casca (figura 5).

Figura 5 Western Blotting 1D da carne e casca do camarão para cada indivíduo alérgico separado em grupos considerando os resultados de ImmunoCAP conforme mostrado na figura 4. A região destacada em verde mostra a região de reconhecimento da tropomiosina. As linhas tracejadas indicam as regiões que apresentavam diferença de reconhecimento entre camarão e casca quando testado contra o *pool* de soros. Neg – negativo, Pos – Positivo, tropo – tropomiosina, marcador de massa molecular (MM), extrato da casca do camarão (CS), indivíduos alérgicos (1-18) e controle negativo do anticorpo secundário (AS).

As regiões que apresentaram diferença quando testadas contra o pool de soros não se mantiveram quando testados individualmente, sendo que os resultados para camarão e casca são muito semelhantes, não sendo possível destacar nenhuma banda sendo reconhecida somente em um ou outro extrato.

Ao comparar-se os resultados do WB individual com os resultados de ImmunoCAP observa-se que realmente não ocorre reatividade a IgE na região da tropomiosina para os indivíduos negativos para esta proteína no ImmunoCAP, exceto para o indivíduo 10 que apresenta uma leve banda sendo reconhecida na região que poderia ser

tropomiosina, entretanto não se pode afirmar pois é uma região que apresenta outras proteínas com massa molecular muito semelhante como a arginina quinase.

Também foi realizado WB 1D individualmente com o grupo de indivíduos não alérgicos para observar o padrão de reconhecimento IgE (figura 6). Várias bandas foram reconhecidas de forma heterogênea.

Figura 6 Western Blotting 1D para os indivíduos não alérgicos. A - carne do camarão e B - casca do camarão. Marcador de massa molecular (MM), extrato da carne do camarão (CM), extrato da casca do camarão (CS) e indivíduos não alérgicos (19-27). O tracejado em vermelho mostra a região de reconhecimento da tropomiosina.

Para uma melhor visualização e separação das proteínas presentes nos extratos para posterior identificação foi realizado um gel de eletroforese 2D com fitas de 7 centímetros e ponto isoelétrico de 3 a 10 como triagem (figura 7), com isso foi possível enxergar que a maioria das proteínas se encontravam entre os pontos isoelétricos entre 4 a 7.

Figura 7 (A) Eletroforese 2D em gel de acrilamida 10% do extrato da carne do camarão. (B) Eletroforese 2D em gel de acrilamida 10% do extrato da casca do camarão.

Para uma investigação mais profunda sobre as proteínas reconhecidas, com o pool do soro dos indivíduos alérgicos (1-18), foi realizado um WB 2D, com fita de 7 centímetros e ponto isoelétrico de 4 a 7. As eletroforeses 2D foram realizadas com os extratos em duas formas, filtrado para tentar eliminar artefatos e não filtrado, porém observamos que ao filtrar algumas proteínas são perdidas no processo. Foram detectados vários spots IgE-específicos entre 150 e 21 kDa em camarão e para casca entre 225 e 24 kDa aproximadamente (figura 8 e 9).

Figura 8 Eletroforese 2D em gel de acrilamida 10% do extrato da carne do camarão (A) extrato filtrado e (C) extrato não filtrado, com os spots reconhecidos pelos indivíduos alérgicos que foram excisados a partir do *Western Blotting* 2D (B e D) com *pool* de soro dos indivíduos alérgicos testados com extrato da carne do camarão.

Figura 9 Eletroforese 2D em gel de acrilamida 10% do extrato da casca do camarão (A) extrato filtrado e (C) extrato não filtrado, com os spots reconhecidos pelos indivíduos alérgicos que foram excisados a partir do *Western Blotting* 2D (B e D) com *pool* de soro dos indivíduos alérgicos testados com extrato da casca do camarão.

De todos os spots que foram revelados na membrana, 28 foram recortados dos géis (figuras 8 e 9) e 20 identificados (Tabela 3), sendo que todos eles já foram descritos em outras espécies de camarão exceto a proteína citocromo c oxidase subunidade I. Os spots 1, 8, 9, 27, 28 e 30 foram reconhecidos como tropomiosina, 2, 3, 32, 39, 46 e 47 como arginina quinase, 4 como proteína sarcoplasmática de ligação ao cálcio e cadeia leve de miosina, 21 e 22 como actina, 23 e 24 como cadeia pesada de miosina, 25 e 44 hemocianina e 29 como citocromo c oxidase subunidade I.

Os demais *spots* recortados não foram identificados.

Tabela 4 Identificações obtidas a partir da análise de espectrometria de massas dos spots excisados do gel 2D com ponto isoelétrico entre 4 e 7.

	Spot	Identificação	Massa Molecular teórica	Ponto Isoelétrico teórico	Massa Molecular estimada no gel	Reconhecido pela IUIS
Camarão	1 e 30	Tropomiosina	34-38 kDa	4,5-4,7	~38 kDa	Sim
	27 e 28	Tropomiosina	34-38 kDa	4,5-4,7	~27 kDa	Sim
	2, 3, 32 e 39	Arginina quinase	40-45 kDa	6 - 6,5	~38 kDa	Sim
	4	Proteína Sarcoplasmática de ligação ao cálcio e Cadeia leve	20-25 kDa/ 17,5-20 kDa	4,6-4,8 kDa/ 4,2-4,5 kDa	~20 kDa	Sim
	19	SEM IDENTIFICAÇÃO	—	—	~42 kDa	—
	23 e 24	Cadeia Pesada de Miosina	200- 225 kDa	—	~130-140 kDa	Não
	25	Hemocianina	90 kDa	—	~90 kDa	Não
	29	Citocromo C oxidase subunidade I	—	—	~22 kDa	Não
	35- 38	SEM IDENTIFICAÇÃO	—	—	~20 kDa	—
Casca	7	NÃO RECORTADO	—	—	~110 kDa	—
	8 e 9	Tropomiosina	34-38 kDa	4,5-4,7	~38 kDa	Sim
	14 e 15	SEM IDENTIFICAÇÃO	—	—	~20-15 kDa	—
	21 e 22	Actina	41-42 kDa	5,3-5,5	~43 kDa	Não
	44	Hemocianina	90 kDa	—	~90 kDa	Não
	46 e 47	Arginina Quinase	40-45 kDa	6 - 6,5	~40 kDa	Sim
	48	SEM IDENTIFICAÇÃO	—	—	~45 kDa	—
	50	SEM IDENTIFICAÇÃO	—	—	~48 kDa	—

Com as identificações voltamos nos WB 1D individuais a fim de detectar em quais deles cada proteína estaria sendo reconhecida. Foi feito um alinhamento entre os WB 1D, WB 2D e o gel de extrato de camarão 1D e 2D. As proteínas que aparecem como bandas sendo reconhecidas no 1D e não tem um *spot* correspondente no gel 2D foram consideradas possíveis identificações com base nas proteínas já identificadas na

literatura como IgE reativas em camarão. Sendo assim, a banda reconhecida em torno de 12 kDa no WB 1D foi considerada provável tioredoxina, a banda em torno de 60 kDa provável piruvato quinase. As bandas reconhecidas em torno de 70 kDa e entre 32-36 kDa permanecem identificadas e são referidas apenas com a massa molecular estimada. Foi possível então calcular a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e eficiência de cada uma das proteínas em relação ao diagnóstico de alergia a camarão. A tropomiosina apresentou 100% de especificidade e também de VPP, bem como a provável tioredoxina e a proteína com cerca de 70 kDa.

A figura 10 mostra como foi feita a marcação de cada proteína reconhecida individualmente no WB 1D, considerando quantos indivíduos alérgicos e quantos não alérgicos reconhecem cada proteína. A tabela 5 mostra todos os valores calculados a partir de então.

Figura 10 Alinhamento do gel 2D com *Western Blotting* 1D para determinação individual de reconhecimento IgE específico para as diferentes proteínas identificadas. A – Gel 2D do extrato de carne de camarão. B – Gel 1D do extrato de carne de camarão. C – *Western Blotting* 1D dos soros individuais. As cruzes indicam onde a proteína foi reconhecida. A região destacada em verde contém diversas proteínas dificultando a análise, portanto não é possível fazer a análise. CM – Carne de camarão.

Tabela 5 Valor de cada proteína IgE reativa identificada em relação à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência para essa população estudada.

Proteína	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficiência
Cadeia pesada de miosina	50	67	75	40	55
Hemocianina	89	22	69	50	67
Piruvato quinase (?)	72	44	72	40	63
Actina	22	89	80	36	44
35kDa (??)	22	67	57	30	37
Citocromo C oxidase	55	78	83	47	63
Spots 35 – 38 (?)	28	100	100	41	52
Sarcoplasmática ligadora de cálcio	39	89	87	42	55
Cadeia leve de miosina	28	89	83	38	48
Tioredoxina (??)	11	100	100	36	41
Tropomiosina	61	100	100	53	74

6. DISCUSSÃO

Alergia a camarão é uma das mais importantes dentre as alimentares em adultos e até o momento não há descrição das proteínas alergênicas presentes no camarão sete-barbas, espécie muito produzida e consumida em nosso país. Até o momento a restrição alimentar é o único tratamento disponível. Os testes de provocação oral duplo cego placebo-controlados são geralmente aceitos como padrão-ouro e são particularmente úteis para fornecer condutas definitivas aos pacientes em relação à restrição de alimentos. O presente trabalho buscou identificar pela primeira vez as proteínas IgE reativas presentes no sete-barbas, além de buscar a presença de alérgenos diferencialmente expressos na carne ou na casca do camarão.

Foi realizada a extração proteica em camarões pescados em duas épocas diferentes do ano o extrato 1 é de Janeiro de 2017 (onde a temperatura da água costuma ser mais alta por conta do verão) e o extrato 2 de Junho de 2017 (onde a temperatura costuma ser um pouco mais baixa por conta do outono) (figura 2), é possível observar que há uma diferença na composição proteica dos extratos. Entre uma pescaria e outra houve um período de defeso (proibição temporária da pesca)⁶², que aconteceu entre os meses de Março a Maio de 2017. Em Janeiro há predominância de camarões adultos e em abril de camarões jovens. A disponibilidade de alimento, o tipo do sedimento, a salinidade, a profundidade e a temperatura, são variáveis fundamentais na distribuição espacial e temporal dos camarões marinhos⁶³.

Camarões são animais pecilotermos (de sangue frio) que não conseguem manter a temperatura corporal constante, ou seja, a temperatura corporal varia de acordo com as oscilações da temperatura da água, quanto maior for a temperatura da água (evidentemente, que dentro dos limites de conforto de cada espécie), mais intensas serão

as suas atividades metabólicas ^{63,64}. A espécie *X. kroyeri* tolera uma variação de temperatura entre 15 e 30°C ⁶³.

Foi realizado WB 1D com *pool* dos soros dos dois grupos para carne de camarão e casca e é possível ver reconhecimento de várias bandas proteicas presente no extrato, sendo que os perfis de camarão e casca não são idênticos (figura 4).

Ao observarmos no WB 1D individual dos dois grupos é possível observar que no grupo de alérgicos (figura 5) há reconhecimento IgE de quase todos os indivíduos de bandas com peso molecular entre 36-45 kDa em ambos os extratos. Nos indivíduos não alérgicos (figura 6) é observado reconhecimento IgE da maioria dos indivíduos em bandas com peso molecular entre 36-40 kDa. Se a presença dessas proteínas IgE específicas irá se traduzir em sintomas clínicos de alergia depende de vários fatores, como níveis de IgE totais e específicos no sangue, epítomos específicos de IgE e seu grau de policlonalidade (mono ou polissensibilizado), o equilíbrio em células T reguladoras e Th1/Th2, o polimorfismo dos receptores de alta afinidade a IgE (FcεRI). Os indivíduos assintomáticos podem ser mais frequentemente monossensibilizados enquanto os indivíduos sintomáticos são mais constantemente polissensibilizados. Existem muitas questões a serem respondidas quando se trata de entender como a sensibilização a IgE específica pode ser traduzida para alergia clínica ^{5,65}. Pela massa molecular e intensidade das bandas reconhecidas no grupo dos não alérgicos é possível inferir que a banda proteica corresponderia à tropomiosina, o que levanta a hipótese de uma possível sensibilização por ácaros domésticos.

A tropomiosina é uma grande responsável por reação cruzada entre ácaros domésticos e camarão, num estudo realizado no Canadá foi visto que 90% dos indivíduos alérgicos a camarão testados eram sensibilizados a ácaros de poeira doméstica e quando analisado no contexto oposto a minoria dos indivíduos apresenta

positividade para camarão, isso acontece pelo fato de que nos ácaros a tropomiosina não é o alérgeno principal já no camarão sim ⁶⁶.

Em relação aos extratos utilizados para os testes cutâneos, os que estão presentes no ImmunoCAP e o camarão utilizado para o TPO existe uma grande discrepância entre as diferentes espécies presentes nas diferentes fontes, bem como no preparo.

O extrato comercial usado para os testes cutâneos é preparado a partir de *Penaeus setiferus* cozido e os extratos de camarão usados no ImmunoCAP f24 (específico para camarão) são das espécies: *Pandalus borealis*, *Penaeus monodon*, *Metapenaeopsis barbata*, *Metapenaeus joyneri*. Segundo o fabricante, a espécie *P. borealis* tem seu extrato cozido e congelado enquanto os demais têm seus extratos crus e congelados adicionados ao *pool* utilizado para o teste automatizado ⁶⁷.

Alguns trabalhos ^{24,68,69} mostram que o cozimento do camarão aumenta a reatividade IgE específica de alguns alérgenos, além de permitirem o surgimento de neoalérgenos a partir de mudanças na conformação das proteínas e exposição de epítomos não expostos na proteína *in natura*. A formação de neoalérgenos é conhecida há quase quatro décadas ⁷⁰ e esta pode ser uma das razões do porquê algumas pessoas podem tolerar um alimento cru, mas irá reagir a este mesmo alimento processado. Estudos mostraram a formação de neoalérgenos em nozes ⁷¹, farinha de trigo⁷², amendoim torrado ⁷³, lentilha ⁷⁴, amêndoas e castanha de caju ⁷⁵, soja ^{76,77}, camarão, atum, ovos, maçã, ameixa, leite e batata ⁷⁸⁻⁸⁰. Apesar disso, no extrato utilizado no ImmunoCAP das quatro espécies de camarão apenas uma tem seu extrato feito a partir do camarão cozido.

Das quatro espécies presentes no ImmunoCAP apenas temos a identificação de tropomiosina para *Pandalus borealis* e nenhuma outra proteína alergênica já foi

identificada em nenhuma das espécies presentes. A maioria das proteínas alergênicas para camarão reconhecidas pela IUIS, além da tropomiosina, foram identificadas em *Crangon crangon* (camarão do mar do norte), não encontrada em nosso litoral, ou em *Litopenaeus vannamei* (camarão branco), espécie consumida principalmente na região nordeste do Brasil, entretanto não presente em nenhum extrato comercial disponível, nem no ImmunoCAP. Já o extrato usado para tropomiosina de camarão (f351) é da espécie *Penaeus aztecus*⁶⁷.

O presente estudo utilizou extrato de carne de camarão e casca após aquecimento, a fim de se aproximar das condições de consumo, já que a comparação entre diferentes tipos de processamento não é foco do trabalho. As amostras foram submetidas a um minuto de aquecimento no microondas, que foi o mesmo procedimento utilizado no trabalho anterior, no qual os indivíduos foram selecionados, para os testes cutâneos e de provocação oral.

Teste cutâneo, é um método amplamente utilizado para análise da sensibilização a determinados antígenos⁸¹, sendo um método rápido, simples e bastante acessível. Sua principal desvantagem é a falta de padronização, pois o resultado depende dos tipos de extratos utilizados e da experiência do profissional responsável pela análise. Além disso, sua especificidade varia de acordo com a condição alérgica do indivíduo⁸². Os extratos comerciais utilizados não são padronizados e seu preparo é feito a partir de matéria prima complexa, heteróloga e instável. São compostos por uma mistura de proteínas, carboidratos, glicoproteínas, enzimas entre outras substâncias, por essa razão atualmente é mais recomendado que seja realizado o teste com alimento *in natura*⁸³. Por esse motivo é tão importante o estudo de novos alérgenos alimentares, para auxiliar a compor de forma mais completa os extratos utilizados para testes tanto *in vivo* como *in vitro*.

Os epítomos de ligação a IgE podem ser divididos em dois tipos, linear (sequencial) e conformacional (descontínuo). Os epítomos lineares compreendem sequências contínuas de aminoácidos, enquanto que os epítomos conformacionais são formados por aminoácidos espacialmente adjacentes que estão distantes na sequência primária de aminoácidos das proteínas. Muitos alérgenos permanecem não identificados por causa da biodiversidade, especialmente em frutos do mar ⁸⁴.

De todos os alérgenos descritos para camarão apenas alguns tem seus epítomos identificados, em tropomiosina foram encontrados nove epítomos, arginina quinase oito, cadeia leve de miosina seis e proteína sarcoplasmática de ligação ao cálcio três⁸⁴.

No primeiro WB 2D com pI entre 3 a 10 (figura 7) foram revelados vários spots reativos a IgE entre 120- 20 kDa e para uma melhor separação e aumento da região no gel onde foram detectados esses spots foi feito um segundo WB 2D com fita de pI entre 4 a 7 e um *pool* com o soro dos indivíduos alérgicos (figura 8 e 9). Desse experimento, 20 *spots* puderam ser identificados por espectrometria de massas. Foram identificadas proteínas homologas a outras já descritas anteriormente em outras espécies de camarão (tabelas 1 e 4).

Dentre elas, os *spots* 1, 8, 9, 27, 28 e 30 proteína homóloga a tropomiosina (36-38 kDa) foi o primeiro alérgeno descrito em camarão em 1981 ⁸⁵, presentes em células musculares e não musculares. Quando dentro do músculo estriado medeiam a interação troponina- actina para assim regular a contração muscular, é um alérgeno altamente estável ao calor e em altas temperaturas sua alergenidade é mais alta, possui alta reatividade cruzada com ácaros domésticos, outros crustáceos e moluscos ³². Além da tropomiosina de camarão também houve identificação da tropomiosina dos ácaros *D. farinae* e *D. pteronyssinus*.

Nos *spots* 2, 3, 32, 39, 46 e 47 proteína homologa à arginina quinase (40-45 kDa) descrita em 2003 ⁸⁶ é um alérgeno tão expressivo quanto a tropomiosina em indivíduos que apresentam alergia a camarão, mas ao contrário do que acontece com a tropomiosina o calor diminui sua alergenicidade, apresenta reatividade cruzada também com ácaros, outros crustáceos e moluscos ³², tal como a tropomiosina. Possui propriedades de regulação e transporte em células musculares e uma de suas funções é transformar ADP em ATP ³².

O *spot* 4 corresponde à proteína homologa a proteína sarcoplasmática de ligação ao cálcio (20-25 kDa- pI 4,6-4,8) descrita em 2009 na espécie *L. vannamei* ⁸⁷ e proteína homóloga à cadeia leve de miosina (17,5- 20 kDa – pI 4,2-4,5) descrita em 2008 na espécie *L. vannamei* ⁸⁸. Ambas são descritas com peso molecular e pontos isoelétricos bem próximos o que justifica sua presença concomitante no mesmo *spot*.

A proteína sarcoplasmática de ligação ao cálcio, diferentemente do que é visto nas outras duas proteínas acima citadas esta não apresenta reatividade com ácaros ou moluscos estando relacionado com reatividade cruzada somente com outros crustáceos. É responsável por promover o relaxamento muscular, é termoestável e resistente ao tratamento ácido e alcalino, porém após 1 hora de digestão péptica é completamente digerida ³². Existem três isoformas já descritas com pI entre 5,0-4,7 ⁸⁹ e todas elas mostram capacidade de ligação IgE ³². Esta foi proteína foi reconhecida no WB 1D mas não no WB 2D. Esse não reconhecimento IgE pode não ter ocorrido pelo fato de que todo o processo de eletroforese 2D é muito agressivo para as proteínas, fazendo com que elas acabem se degradando no meio do processo.

As miosinas fazem parte de uma superfamília de proteínas musculares que participam do processo de contração muscular ³² e são altamente resistentes ao calor ⁹⁰.

O mesmo que ocorreu com a proteína sarcoplásmica de ligação ao cálcio em relação a não reatividade IgE no WB 2D ocorreu nos *spots* 21 e 22 onde foi identificada uma proteína homologa à actina. Essa proteína contém duas isoformas bem definidas, α -actina que é expressa principalmente em músculo esquelético, cardíaco e liso. Os filamentos de actina fornecem suporte mecânico interno para manter a forma da célula, bem como a força para impulsionar os movimentos celulares e o transporte intracelular, além disso, também estão envolvidos na coordenação dos movimentos de organelas, como mitocôndrias, vesículas de Golgi ou peroxissomas, controlando junções célula-célula e polaridade celular ⁹¹.

A proteína β -actina foi bem caracterizada em algumas espécies de camarão como *Penaeus monodon* ⁹² e *Litopenaeus vannamei* ⁹³.

Cada isoforma de actina é notavelmente similar a todas as outras isoformas, com pequenas variações na sequência de aminoácidos. As actinas β (beta) e γ (gama), por exemplo, diferem apenas de quatro resíduos, sugerindo uma forte pressão evolutiva para manter essas pequenas diferenças de sequência ⁹¹.

Os *spots* 23 e 24 foram identificados como proteína homologa a cadeia pesada de miosina, envolvida no processo de contração muscular juntamente com a cadeia leve de miosina. Acredita-se que a cadeia pesada de miosina pode estar relacionada com reatividade cruzada entre moluscos, crustáceos e aracnídeos ³².

Os *spots* 25 e 44 foram identificados como uma proteína homóloga a hemocianina (~90 kDa), que foi descrita na espécie de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, é uma proteína de transporte de oxigênio na hemolinfa de crustáceos, que é um fluido que possui as mesmas funções do sangue porém com uma composição diferente. É também um alérgeno estável ao calor ^{32,39,94,95}.

O *spot* 29 foi identificado como citocromo c oxidase subunidade I, esse gene é responsável por codificar uma proteína responsável pela catálise terminal da cadeia respiratória mitocondrial, a qual está envolvida com o transporte de elétrons e com a translocação de prótons através da membrana ^{96,97}. Esse gene é um marcador mitocondrial frequentemente utilizado para estudos evolutivos por ser a maior das três subunidades mitocondriais codificadoras da proteína citocromo oxidase ^{98,99} e por sua sequência proteica conter domínios funcionais altamente conservados e também regiões variáveis ^{96,97}. Os genes mitocondriais citocromo c oxidase subunidade I, foram utilizados para um estudo de diferenciação entre as espécies de *X. kroyeri* e *X. riveti* ¹⁰⁰ mostrando a especificidade dessa molécula para a espécie estudada. Mas na literatura não há descrição alguma desta proteína como sendo alergênica, sendo esta então um possível novo alérgeno. O único relato na literatura é uma descrição da subunidade III do citocromo c oxidase descrito como alérgeno no parasita *Anisakis simplex* ¹⁰¹.

Também foi realizado WB 2D com pI entre 6 a 10, porém não foram obtidos resultados satisfatórios.

No presente estudo a especificidade representa a probabilidade de um indivíduo não alérgico ser negativo para uma determinada proteína, enquanto a sensibilidade vai aqui refletir a probabilidade de um indivíduo alérgico ser positivo para uma determinada proteína. VPP aponta a probabilidade de um indivíduo IgE-positivo para certa proteína ser realmente alérgico. Quando esse valor é alto é um indicativo de que a proteína em questão pode vir a ser um bom marcador de alergenidade. Por outro lado, VPN alto pode indicar um bom fator para afastar o diagnóstico de alergia, já que representa a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com testes negativos. Vale ressaltar que os valores foram calculados para uma pequena população, que é o

grupo de estudo do presente trabalho e que se faz necessária a validação dos resultados obtidos para uma população alérgica maior.

De acordo com os resultados obtidos (tabela 5) podemos observar que a hemocianina é a proteína que apresenta a maior sensibilidade (89%) e as proteínas cadeia pesada de miosina, actina, citocromo c oxidase, sarcoplasmática ligadora de cálcio e cadeia leve de miosina apresentam um VPP e especificidade superior a 75% exceto cadeia pesada de miosina que apresenta uma especificidade um pouco menor (67%).

As proteínas dos *spots* 35-38, tiredoxina e tropomiosina apresentam um VPP e especificidade de 100% o que nos mostra que essas proteínas são excelentes como marcadores no nosso grupo de indivíduos testados, elas poderiam ser incluídas como ferramenta diagnóstica na alergia a camarão, com o intuito de melhorar os testes diagnósticos disponíveis, mas seriam necessárias análises em um grupo de estudo maior.

Para camarão como já citado a tropomiosina é um alérgeno considerado *major* em indivíduos alérgicos a camarão e apesar de sua reatividade cruzada com tropomiosinas de ácaros e barata sua alergenidade nesses casos não é tão significativa, pois este é um alérgeno *minor*, o que o torna altamente significativo em alérgicos a camarão.

Para essas proteínas com VPP superior a 75% seria interessante testar num grupo de estudo maior para confirmar a importância dessa proteína como marcador diagnóstico um resultado mais relevante.

As proteínas representadas com o ponto interrogação (?) na figura 10 não foram identificadas em nossas análises, são apenas sugestões de possíveis alérgenos com base meramente em seu peso molecular e dados presentes na literatura.

Este estudo trata da primeira identificação de moléculas IgE reativas presentes no camarão e na casca separadamente e especificamente da espécie *X. kroyeri* que é altamente consumida aqui no Brasil. Foram encontradas proteínas homólogas a alérgenos já mostrados em outras espécies de camarão. Esta abordagem não buscou a classificação de quais seriam primários ou secundários uma vez que o WB 2D foi feito utilizando soros agrupados.

Os sulfitos são agentes multifuncionais, com capacidade de prevenir em alimentos o escurecimento enzimático e não enzimático, controlar o desenvolvimento microbiológico, atuar como agente branqueador, antioxidante ou redutor¹⁰². O mais utilizado para conservação de camarão é o metabissulfito de sódio para evitar o aparecimento de pontos pretos (*black spot* ou melanose). A melanose é consequência de uma reação enzimática oxidativa, esta resposta ocorre no exoesqueleto do camarão, podendo atingir a musculatura¹⁰³.

Como não observamos uma diferença entre as proteínas IgE reativas presentes na casca em comparação com as que estão presentes na carne do camarão podemos concluir que os indivíduos que desencadeiam alguma reação somente ao consumir camarão com casca na verdade apresentam reatividade ao sulfito e não a casca do camarão.

7. CONCLUSÃO

Essa é a primeira descrição de alergia para a espécie de camarão *X. kroyeri*, popularmente conhecido como camarão sete barbas, mostrando reatividade a IgE específica em pacientes alérgicos a camarão. Foi possível identificar alguns homólogos de alérgenos de outras espécies de camarão como a tropomiosina, arginina quinase, proteína de ligação sarcoplasmática de cálcio, cadeia leve de miosina, actina, hemocianina e cadeia pesada de miosina. Além disso, foi identificada a subunidade I de citocromo c oxidase descrita pela primeira vez como potencial alérgeno de camarão.

Pela primeira vez o perfil de sensibilização de pacientes com alergia a camarão foi comparado a um grupo de pacientes não alérgicos e os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo puderam ser calculados. A tropomiosina apresentou 100% de especificidade e também de VPP, bem como a provável tioredoxina e a proteína de 70 kDa. Essas duas últimas proteínas podem ser novos marcadores de alergia a camarão.

Não foi possível destacar uma ou outra proteína reativa exclusivamente na casca ou na carne de camarão, o que indica que provavelmente a reação relatada por alguns pacientes seja uma reação ao sulfito e não à casca.

Os perfis de sensibilização de pacientes com alergia a camarão são complexos e o estudo destes perfis em grupos maiores de pacientes pode fornecer dados de proteínas alergênicas que auxiliem na confirmação ou exclusão do diagnóstico, aumentando a especificidade e sensibilidade dos testes disponíveis.

8. REFERÊNCIAS

1. EAACI. European Academy of Allergy and Clinical Immunology - Global Atlas of Allergy. Vol 4062014.
2. Abbas, AK LA, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular* 7ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
3. Campbell DE, Boyle RJ, Thornton CA, Prescott SL. Mechanisms of allergic disease - environmental and genetic determinants for the development of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(5):844-858.
4. Geller MS, Morton. *Diagnóstico e Tratamento das Doenças Imunológicas*. Vol 2ª edição: Elsevier; 2015.
5. Remington B, Broekman HCH, Blom WM, et al. Approaches to assess IgE mediated allergy risks (sensitization and cross-reactivity) from new or modified dietary proteins. *Food Chem Toxicol*. 2017;112:97-107.
6. Lieberman, P GL. Mast Cells and Anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016.
7. Charles, A Janeway J TP, Walport M, Shlomchik MJ. *Effector mechanisms in allergic reactions*.: Garland Science; 2001.
8. Simons, FER. Anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2):S161-S181.
9. Finkelman FD, Khodoun MV, Strait R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(6):1674-1680.
10. Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(2):335-348.
11. ASBAI. Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia - Informações ao Público - Polinose. <http://www.sbai.org.br/secao.asp?s=81&id=300> .2009.
12. Galvão C, CASTRO F. Respiratory allergies. 2005;84 (1):18-24.
13. Khan DA. Allergic rhinitis and asthma: epidemiology and common pathophysiology. *Allergy Asthma Proc*. 2014;35(5):357-361.
14. Hanifin, JM RG. Diagnostic Features of Atopic- Dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*. . 1980. 15. Birnbaum J, Vervloet D, Charpin D. Atopy and systemic reactions to hymenoptera stings. *Allergy Proc*. 1994;15(2):49-52.
16. Johansson SG, Lundahl J. Asthma, atopy, and IgE: what is the link? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001;1(2):89-90. 17. Przybilla, B, F R. Hymenoptera venom allergy. Vol 114. *J Dtsch Dermatol Ges*.2010:127-130.
18. Helbling A, Hurni T, Mueller UR, Pichler WJ. Incidence of anaphylaxis with circulatory symptoms: a study over a 3-year period comprising 940,000 inhabitants of the Swiss Canton Bern. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(2):285-290.
19. Abril-Gil M, Garcia-Just A, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PLoS One*. 2015;10(4):e0125314.
20. Lasekan AO, Nayak B. Effects of buffer additives and thermal processing methods on the solubility of shrimp (*Penaeus monodon*) proteins and the immunoreactivity of its major allergen. *Food Chem*. 2016;200:146-153.
21. Cabrera CM, Urra JM. Food allergy and the oral immunotherapy approach. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015;63(1):31-39.
22. Berin MC, Sampson HA. Food allergy: an enigmatic epidemic. *Trends Immunol*. 2013;34(8):390-397.

23. Davis PJ, Williams SC. Protein modification by thermal processing. *Allergy*. 1998;53(46 Suppl):102-105.
24. Zailatul Hani Mohamad Yadzir RM, Faizal Bakhtiar , Noormalin Abdullah , and Shahnaz Murad. Tropomyosin and Actin Identified as Major Allergens of the Carpet Clam (*Paphia textile*) and the Effect of Cooking on Their Allergenicity. Vol Volume 2015 (2015). Article ID 254152: BioMed Research International; 2015:6.
25. Abramovitch JB, Lopata AL, O'Hehir RE, Rolland JM. Effect of thermal processing on T cell reactivity of shellfish allergens - Discordance with IgE reactivity. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173549.
26. Abramovitch JB, Kamath S, Varese N, et al. IgE Reactivity of Blue Swimmer Crab (*Portunus pelagicus*) Tropomyosin, Por p 1, and Other Allergens; Cross-Reactivity with Black Tiger Prawn and Effects of Heating. *PLoS One*. 2013;8(6):e67487.
27. Niggemann B, Beyer K. Pitfalls in double-blind, placebo-controlled oral food challenges. *Allergy*. 2007;62(7):729-732.
28. Kobernick AK, Burks AW. Active treatment for food allergy. *Allergology International*. 65(4):388-395.
29. Pawankar, R, Canonica GW, Holgate ST, RF L. *WAO White Book on Allergy*.: World Allergy Organization; 2011.
30. A A, C A. Global Atlas of Allergy.European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2014.
31. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S116-125.
32. Pedrosa M, Boyano-Martínez T, García-Ara C, Quirce S. Shellfish Allergy: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015;49(2):203-216.
33. Kandyil RM, Davis CM. Shellfish allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20(5):408-414; quiz 414.
34. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review. *Mar Biotechnol (NY)*. 2003;5(4):339-348.
35. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations.The state of world fisheries and aquaculture SOFIA. Rome: Fisheries and Aquaculture Department2008:178. 36. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations.FAO yearbook Fishery and Aquaculture Statistics: Rome: Fisheries and Aquaculture Department; 2010:81.
37. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Capture production FISHSTAT Plus Universal software for fishery statistical time series; 2007.
38. Asero R, Scala E, Villalta D, et al. Shrimp allergy: analysis of commercially available extracts for in-vivo diagnosis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016:0.
39. Faber MA, Pascal M, El Kharbouchi O, et al. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy*. 2016.
40. Pascal M, Grishina G, Yang AC, et al. Molecular Diagnosis of Shrimp Allergy: Efficiency of Several Allergens to Predict Clinical Reactivity. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;3(4):521-529.e510.
41. Ayuso R, Lehrer SB, Reese G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(1):27-37.
42. Yang AC, Arruda LK, Santos AB, et al. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(4):872-878.

43. García-Orozco KD, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderón-de-la-Barca AM, Sotelo-Mundo RR. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;144(1):23-28.
44. <http://www.allergome.org/>. 2017.
45. <http://www.iuisonline.org/>. 2017.
46. DIAS, NETO J. IBAMA. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Diretoria de uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas. . Brasília, DF. : Coordenação-Geral de Autorização de uso e Gestão de Fauna e Recursos Pesqueiros.Proposta de Plano Camarões Marinhos no Brasil.; 2011:242.
47. Gusmão, J., C. L, Monteiro FAS-C, A.M. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific sea bob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *iphopenaeus riveti*.: Marine Biology; 2006.
48. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Current understanding of food allergens. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;964:69-85.
49. Genov I, al. e. Tropomiosinas e reatividade cruzada. *Rev bras alerg imunopatol* 2009.
50. Carrapatoso I. Cross-reactivity between foods of the same groups: review article. 2004.
51. Solé D, Silva LR, Filho NAR, Sarni ROS. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2007. *Rev. Méd. Minas Gerais*; 2008.
52. OXON. JFMD. FURTHER OBSERVATIONS ON THE TREATMENT OF HAY FEVER BY HYPODERMIC INOCULATIONS OF POLLEN VACCINE. 1911;178(4594):814-817.
53. NOON L. Prophylactic inoculation against hay fever. Historical document. *Ann Allergy*. 1960;18:287-291.
54. Galli SJ. Toward precision medicine and health: Opportunities and challenges in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1289-1300.
55. Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med*. 2015;372(9):793-795.
56. Muraro A, Lemanske RF, Castells M, et al. Precision medicine in allergic disease-food allergy, drug allergy, and anaphylaxis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Allergy*. 2017;72(7):1006-1021.
57. van Hage M, Hamsten C, Valenta R. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):974-977.
58. Wawrzyniak M, O'Mahony L, Akdis M. Role of Regulatory Cells in Oral Tolerance. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017;9(2):107-115.
59. Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*. 2005;5(10):2497-2507.
60. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4354.
61. An. Shevchenko MW, O. Vorm, O. N. Jensen, A. V. Podtelejnikov, G. Neubauer, Al. Shevchenko,, Mann PMaM. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. 1996.
62. Branco JO. Biologia e pesca do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea, Penaeidae), na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*; 2005.
63. LOPES J, VASQUES R, GUIMARÃES F, CETRA M, COUTO E. PROPORÇÃO SEXUAL DO CAMARÃO SETE-BARBAS *Xiphopenaeus kroyeri* NA

- COSTA DE ILHÉUS, BAHIA, BRASIL. São Paulo: Bol. Inst. Pesca; 2010.
64. Neto RCBJAO. *Camarões Marinhos Engorda - Vol.2*. APRENDA FACIL - CPT; 2002.
 65. Bousquet J, Anto JM, Bachert C, et al. Factors responsible for differences between asymptomatic subjects and patients presenting an IgE sensitization to allergens. A GA2LEN project. *Allergy*. 2006;61(6):671-680.
 66. Rosenfield L, Tsoulis MW, Milio K, Schnittke M, Kim H. High rate of house dust mite sensitization in a shrimp allergic southern Ontario population. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2017;13:5.
 67. <http://www.phadia.com/en/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Allergen-Information/Food-of-Animal-Origin/Shellfish/Shrimp/>.
 68. Yadzir ZH, Misnan R, Abdullah N, Bakhtiar F, Arip M, Murad S. Identification of the major allergen of *Macrobrachium rosenbergii* (giant freshwater prawn). *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2(1):50-54.
 69. Vojdani A. Detection of IgE, IgG, IgA and IgM antibodies against raw and processed food antigens. *Nutr Metab (Lond)*. 2009;6:22.
 70. Spies JR. Allergens. *J Agric Food Chem*. 1974;22(1):30-36.
 71. Malanin K, Lundberg M, Johansson SG. Anaphylactic reaction caused by neoallergens in heated pecan nut. *Allergy*. 1995;50(12):988-991.
 72. Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Guerin L, Morisset M, Kanny G. Anaphylaxis to wheat isolates: immunochemical study of a case proved by means of double-blind, placebo-controlled food challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(4):897-899.
 73. Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(4):763-768.
 74. Ibáñez Sandín D, Martínez San Ireneo M, Marañón Lizana F, Fernández-Caldas E, Alonso Lebrero E, Laso Borrego T. Specific IgE determinations to crude and boiled lentil (*Lens culinaris*) extracts in lentil-sensitive children and controls. *Allergy*. 1999;54(11):1209-1214.
 75. Mengna Su, Mahesh Venkatachalam, Suzanne S Teuber, Kenneth H Roux, Sa SK. Impact of γ -irradiation and thermal processing on the antigenicity of almond, cashew nut and walnut proteins. 2004;84:1119-1125.
 76. Codina R, Oehling AG, Lockey RF. Neoallergens in heated soybean hull. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;117(2):120-125.
 77. Hefle SL, Lambrecht DM, Nordlee JA. Soy sauce retains allergenicity through the fermentation/production process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 115(2):S32.
 78. Bock SA, Atkins FM. Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *J Pediatr*. 1990;117(4):561-567.
 79. Rosen JP, Selcow JE, Mendelson LM, Grodofsky MP, Factor JM, Sampson HA. Skin testing with natural foods in patients suspected of having food allergies: Is it a necessity? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 93(6):1068-1070.
 80. Pastorello EA, Ortolani C, Farioli L, et al. Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94(4):699-707.
 81. Scott H. Sicherer RAW. Allergy Testing in Childhood: Using Allergen-Specific IgE Tests. 2012;129.
 82. Norrman G, Fälth-Magnusson K. Adverse reactions to skin prick testing in children - prevalence and possible risk factors. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20(3):273-278.
 83. Mota A, Kalil JeB, MT. Cutaneos Tests 2005;28.
 84. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int*. 2015;64(4):332-343.
 85. Hoffman DR, Day ED, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy*. 1981;47(1):17-22.

86. Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol.* 2003;170(1):445-453.
87. Ayuso R, Grishina G, Ibáñez MD, et al. Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(1):114-120.
88. Ayuso R, Grishina G, Bardina L, et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(4):795-802.
89. Wnuk W, Jauregui-Adell J. Polymorphism in high-affinity calcium-binding proteins from crustacean sarcoplasm. *Eur J Biochem.* 1983;131(1):177-182.
90. Faber MA, Pascal M, El Kharbouchi O, et al. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy.* 2017;72(6):842-848.
91. Bruce Alberts , Alexander Johnson , Julian Lewis , Martin Raff , Roberts K, . aPW. *Molecular Biology of the Cell , 4th edition.* New York: Garland Science2002.
92. Zhao C, Dai W, Qiu L. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a novel PDRG1 gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Genet Mol Biol.* 2017;40(1):93-103.
93. Sun., *al* PSe. Isolation and characterization of two actins of the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. 2007;151:2145-2151
94. Giuffrida MG, Villalta D, Mistrello G, Amato S, Asero R. Shrimp allergy beyond Tropomyosin in Italy: clinical relevance of Arginine Kinase, Sarcoplasmic calcium binding protein and Hemocyanin. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2014;46(5):172-177.
95. Piboonpocanun S, Jirapongsananuruk O, Tipayanon T, Boonchoo S, Goodman RE. Identification of hemocyanin as a novel non-cross-reactive allergen from the giant freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(10):1492-1498.
96. Saraste M. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics.* 1990;23(4):331-366.
97. Gennis RB. Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1101(2):184-187.
98. Clary DO, Wolstenholme DR. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J Mol Evol.* 1985;22(3):252-271.
99. Beard CB, Hamm DM, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol Biol.* 1993;2(2):103-124.
100. Gusmão J, Lazoski C, Monteiro F, Solé-Cava A. *Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, Xiphopenaeus kroyeri and Xiphopenaeus riveti.* Vol 1492006.
101. López I, Pardo MA. A phage display system for the identification of novel *Anisakis* simplex antigens. *J Immunol Methods.* 2011;373(1-2):247-251.
102. FÁVERO DM, RIBEIRO CSG, AQUINO AD. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios a população. ***Segurança Alimentar e Nutricional.*** 2011;18:11-20.
103. Perazzolo LM. Estudo do sistema imune do camarão marinho *Penaeus paulensis*, com ênfase no sistema pró-fenoloxidase. 1994.

APÊNDICE

Apêndice A: TCLE do ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº
APTO:

BAIRRO: CIDADE
.....

CEP: TELEFONE: DDD (.....)
.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº
APTO:

BAIRRO: CIDADE:
.....

CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Determinação da IgE específica para tropomiosina no diagnóstico da alergia a camarão

2. PESQUISADOR : Paula Rezende Meireles

CARGO/FUNÇÃO: Médica pós-graduanda do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 131254

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☒

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 –Desenho do estudo e objetivo(s)

*A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas. Os sintomas mais comuns são falta de ar, chiado, tosse e dor no peito. Os causadores mais freqüente dessa doença alérgica são os ácaros. Os dois tipos mais comum de ácaros são o *Dermatophagoides pteronyssinus* e a *Blomia tropicalis*. Grande parte dos pacientes podem ter teste de alergia positivos para os dois ácaros. Alguns têm sintomas alérgicos em contato com os dois ácaros, enquanto outros, mesmo com o teste positivo para os dois, só têm reação com um deles. Uma das maneiras de saber qual é o ácaro principal responsável pela alergia é fazer um teste pulmonar no qual o ácaro é inalado. Isso é importante para saber o responsável pela alergia e poder escolher um tratamento direcionado ao causador dos sintomas respiratórios.*

2 –Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros

Serão realizados os seguintes testes e procedimentos:

- **Teste de alergia na pele para identificar se o paciente é sensível ao camarão aos ácaros e baratas**
- **Coleta de sangue (30ml) para avaliar alergia a camarão, ácaros e baratas no laboratório**
- **Teste de provocação oral duplo cego placebo controlado**

do pulmão com ácaros, para ver qual o ácaro é responsável pela alergia. Nesse teste, que é chamado de broncoprovocação, serão realizadas inalações seguidas que são feitas com o próprio ácaro, em quantidades crescentes, seguidas de expiração forçada. Cada paciente reage com uma quantidade diferente, por isso o exame é feito em etapas, começando com uma pequena quantidade. Quando houver a reação alérgica, a força da expiração ficará diminuída. Quando tiver essa queda, o exame é finalizado, e se saberá que o exame é positivo para aquele ácaro. Para realizar esse teste o paciente deverá ficar em observação por 24 horas no hospital, na enfermaria que será realizada a broncoprovocação, para avaliar reação na hora do teste ou mais tarde.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

- **Teste de alergia na pele:** serão colocadas gotas de extrato de ácaros, baratas e camarão, e ainda camarão cru e cozido na parte interna do braço, e com uma pequena agulha perfuramos para a substância entrar em contato com a pele. Após 15 minutos, avalia-se o resultado. Se positivo, você sentirá coceira e uma elevação avermelhada aparecerá no local do teste.

- **Coleta de sangue:** será realizada com agulha e seringa, em veia da parte interna do braço.

- **Teste de provocação oral duplo cego placebo controlado:** *o paciente ficará sentado dentro de uma cabine, que fica na enfermaria do hospital, e em intervalos de tempo realizará inalações de extrato de ácaros em diluições diferentes. Depois de cada intervalo das inalações deverá realizar a medida do volume pulmonar que expira no primeiro segundo. Para realização desse teste, o técnico e o médico estarão na sala junto com o paciente.*

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3

- **Teste de alergia na pele:** leve desconforto e coceira no local, que geralmente é passageira.

- **Coleta de sangue:** desconforto do furo da agulha, e em alguns casos pode ocorrer inchaço, dor, e às vezes pequena mancha arroxeadada no local da picada.

- **Teste de provocação oral duplo cego placebo controlado:** Este é o teste confirmatório de alergia alimentar. Se você tiver alergia a camarão poderá desenvolver sintomas alérgicos que variam em gravidade, de uma pessoa para outra: desde coceira pelo corpo até tosse, falta de ar, vômitos e raramente choque anafilático. Como o médico estará presente supervisionando o teste, você logo será tratado de acordo com a gravidade da reação. Isso será feito através do uso de medicações e cuidados que forem necessários. Como permanecerá em observação hospitalar, se apresentar algum sintoma tardio, será prontamente avaliado pelo médico de plantão, e medicado conforme a prescrição pela equipe de enfermagem e liberado com segurança.

5 – Benefícios para o participante

Participando do projeto, você terá a chance de confirmar o diagnóstico de alergia a camarão e receberá as orientações de como evitar o contato e como tratar reações acidentais.

6 –Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar.

Não há procedimento alternativo vantajoso que permita o diagnóstico definitivo.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O principal investigador é a Dra. Paula Rezende Meireles, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155. 8 andar. Prédio dos Ambulatórios – Secretaria de Imunologia e Alergia Telefone 3069-6098 ou 3069-6225. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa

adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Determinação da IgE específica para tropomiosina no diagnóstico da alergia a camarão”.

Eu discuti com a Dra Paula Rezende Meireles sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Assinatura da testemunha para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Apêndice B: Aprovação ética do protocolo de pesquisa nº 0351/10

APROVAÇÃO

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0351/10**, intitulado: "**VALOR DA DETERMINAÇÃO DE IGE ESPECÍFICA PARA TROPOMIOSINA NO DIAGNÓSTICO DA ALERGIA A CAMARÃO**" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Fabio Fernandes Morato Castro**

Pesquisador (a) Executante: **Paula Rezende Meireles**

CAPPesq, 06 de Julho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Apêndice C: Parecer substanciado da Coordenadoria de Ética em Pesquisa da FMUSP 67399371.6.0000.0068

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação e Caracterização de alérgenos da casca de camarão

Pesquisador: Keity Souza Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 67399371.6.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.030.518

Apresentação do Projeto:

Este é um protocolo voltado para a alergia ao camarão

Objetivo da Pesquisa:

Visa mensurar a reação sérica a proteínas isoladas da casca do crustáceo, valendo-se de soros armazenadas de estudo prévio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem riscos (estudo retrospectivo)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo está corretamente elaborado, e poderá trazer informações úteis

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está em princípio dispensado

Recomendações:

Caso o soro esteja em biobanco, o TCLE realmente não é necessário. Caso esteja em biorrepositório, ou simplesmente estocado, e o TCLE original não contemple a atual fase da pesquisa, um esforço deverá ser desenvolvido, para solicitar novo TCLE, pelo menos dos participantes que comparecem usualmente ao serviço.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br