

**Anne Karoline Rocha Medrado Ventura**

**Identificação de novos alérgenos de mandioca (*Manihot esculenta*)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

**São Paulo**

**2022**

**Anne Karoline Rocha Medrado Ventura**

**Identificação de novos alérgenos de mandioca (*Manihot esculenta*)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

**São Paulo**

**2022**

**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 novos alérgenos de mandioca  
(Manihot esculenta) / Anne Karoline Rocha Medrado  
Ventura. -- São Paulo, 2022.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Keity Souza Santos.

Descritores: 1.Hipersensibilidade alimentar  
2.Alérgenos 3.Western Blotting 4.Proteoma 5.Manihot  
6.Frutose-bifosfato aldolase

USP/FM/DBD-443/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para a humanidade!  
Sejam quais foram os resultados, com êxito ou não, o importante é que no final cada  
um possa dizer: fiz o que pude.”*

Louis Pasteur

## AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus, por ter me dado sabedoria e por ter me sustentado até aqui quando muitas vezes eu achei que não fosse conseguir, pois só Ele sabe o quanto foi difícil.

Minha mãe, que sempre esteve ao meu lado me dando forças para continuar e me fazendo acreditar que tudo isso vai valer a pena.

As meninas do grupo de alergologia molecular, só elas sabem o quanto uma dívida com a CAPES pode ser um grande incentivo para continuar acordando cedo todos os dias. Sou muito grata por todos os cafés terapêuticos, todas as muitas risadas (que foi o que salvou durante todo o processo), vou levar vocês comigo para o resto da vida. Jhosiene Magawa por embarcar nas ideias “científicas” mais absurdas (algumas nem tanto) e por esse ser humano amável que você é. Safiri Paiva e Ariane Lima por todas as palavras novas que só o jeitinho de vocês é capaz de criar, por todos os filmes horríveis e, principalmente, por toda a parceria. Daniele Danella e Jamille Oliveira por todas as conversas e por toda a amizade. Amanda Melato que é quase do grupo e que foi de muita ajuda nessa reta final.

A minha orientadora Profa. Dra. Keity Santos, por todos esses anos de trabalho, pela confiança e paciência.

Aos outros amigos que fiz nesses anos que me ajudaram em diversos momentos: Éderson Xavier por todos os chocolates e as muitas resenhas, com toda a certeza você é um irmão que a vida me deu. Juliana Zanatta, meu unicórnio enfezado, muito obrigada por todos os conselhos, puxões de orelha e bolos de aniversário (que sem dúvida são os melhores). Cassia Terrassani, por todos esses anos de amizade e por tudo o mais que está por vir. Issler Moraes, por quem serei eternamente grata por toda a ajuda e todas as longas conversas sobre a vida.

A Dra. Ana Moretti, por toda a ajuda com os experimentos que, mesmo com um milhão de coisas para fazer, teve a paciência de me ensinar e, com suas mãos de fada, fazer com que as coisas dessem certo.

A Profa. Dra. Lucilene Delazari, pela colaboração e por ter me recebido tão bem quando fui a Botucatu.

A Andréia Kuramoto, César Remuzgo e Washigton da Silva por toda a ajuda e paciência em todas as vezes que precisei de auxílio.

A Roberta Castro, por disponibilizar as amostras para a realização do projeto.

A CAPES e a FAPESP, pelo indispensável apoio financeiro.

A todos os membros da banca, titulares e suplentes, que aceitaram tão prontamente o convite.

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese 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.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

**Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos**

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Resumo**

**Abstract**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 DOENÇAS ALÉRGICAS .....	1
1.2 MECANISMOS DA ALERGIA .....	2
1.3 ALERGIA ALIMENTAR .....	7
1.3.1 Alergia Alimentar Mediada por IgE .....	9
1.3.2 Alergia Alimentar Mediada por Mecanismos Não IgE .....	12
1.3.3 Síndrome da Alergia Oral .....	14
1.4 EPIDEMIOLOGIA DA ALERGIA ALIMENTAR .....	15
1.4.1 Diagnóstico e Tratamento da Alergia Alimentar .....	17
1.5 ALERGIA À MANDIOCA ( <i>MANIHOT ESCULENTA CRANTZ</i> ) .....	18
1.6 ALERGIA AO LÁTEX ( <i>HEVEA BRASILIENSIS</i> ) .....	20
1.7 REATIVIDADE CRUZADA .....	21
1.8 SÍNDROME LÁTEX-FRUTA .....	23
1.9 PROCESSAMENTO DOS ALIMENTOS .....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4 MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1 APROVAÇÃO ÉTICA .....	28
4.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MANDIOCA, FRUTAS E VEGETAIS POR FENOL/ACETATO .....	28
4.3 SHOTGUN .....	29
4.3.1 Digestão de Proteínas em Solução .....	29
4.3.2 Sequenciamento Peptídico por Espectrometria de Massas .....	30
4.3.3 Análise de Dados .....	30
4.4 RECRUTAMENTO DOS INDIVÍDUOS .....	31

4.5 PESQUISA DE IGE ESPECÍFICA <i>IN VITRO</i> (IMMUNOCAP).....	33
4.6 ELETROFORESE 1D E 2D .....	33
4.7 <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	34
4.8 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	35
4.9.1 Clonagem das Sequências de Interesse .....	36
4.9.2 Transformação de Bactérias TOP10 <i>E. coli</i> por Choque Térmico .....	37
4.9.3 Extração e Purificação do DNA Plasmidial .....	37
4.9.4 Quantificação e Avaliação dos Plasmídeos Purificados .....	38
4.10 EXPRESSÃO DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES DA MANDIOCA EM CÉLULAS EXPI293F .....	38
4.11 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EM COLUNA DE CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE A METAIS .....	39
4.12 SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO GÁSTRICA .....	40
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
5.1 ANÁLISE PROTEÔMICA POR SHOTGUN DO EXTRATO PROTÉICO DE MANDIOCA.....	41
5.2 DETECÇÃO DOS ALÉRGENOS DA MANDIOCA E IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS REATIVIDADES CRUZADAS .....	44
5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MANDIOCA IgE-REATIVAS .....	53
5.4 PRODUÇÃO DOS ALÉRGENOS .....	56
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>72</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
1D	Primeira Dimensão
2D	Segunda Dimensão
Å	Angstrom (1nm)
AA	Alergia Alimentar
AGF	Alfa 1-4 Glucano Fosforilase
AP	<i>Allergic Proctocolitis</i>
APCs	Células apresentadoras de Antígeno
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
cAMP	Adenosina 3',5' - Monofosfato Cíclico
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCD	<i>Cross-reactive Carbohydrate Determinants</i>
CEVAP	Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl) Dimethylammonio] -1-Propanesulfonate Hydrate</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CTLA-4	Linfócito T Citotóxico Associado à Proteína 4
DC	<i>Dendritic Cells</i>
DTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EoE	<i>Eosinophilic Esophagitis</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
FBA	<i>Fructose-Biphosphate Aldolase</i>
FPE	<i>Food Protein-Induced Enteropathy</i>
FPIES	<i>Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GARP	<i>Glutamic acid rich protein</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCL	Ácido Clorídrico
HCN	Ácido Cianídrico
<i>Hev b</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IBP	Inibidor de Bomba de Próton
IEF	<i>IsoElectric Focusing</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
ILC2	<i>Innate Lymphoid Cell type 2</i>

IMAC	Cromatografia por Afinidade a Metais
IPG	<i>Immobilized pH Gradient</i>
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i>
KCL	Cloreto de Potássio
kDa	kiloDalton
LB	Luria Bertani
LTP	<i>Lipid Transfer Protein</i>
m/v	Molaridade/Volume
m/z	Massa/Carga
mA	MiliAmpère
<i>Man e</i>	<i>Manihot esculenta</i>
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MM	Marcador Molecular
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NK	<i>Natural Killer</i>
nL/min	Nanolitro/Minuto
non-IgE-GI-Fas	<i>non-IgE Gastrointestinal Food Allergies</i>
OIT	<i>Oral ImmunoTherapy</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAST	<i>RadioAllergoSorbent Test</i>
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i>
RNase	Ribonuclease
SAO	Síndrome da Alergia Oral
SCIT	<i>SubCutaneous ImmunoTherapy</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SPT	<i>Skin Prick Test</i>
TAE	Tris - Acetato - EDTA
TBS	Tampão Tris Salino
TBS- T	Tampão Tris Salino + Tween 20
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCLI	Teste Cutâneo de Leitura Imediata
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th2	<i>T Helper cell type 2</i>
TPO	Testes de Provocação Oral
Treg	Células T Reguladoras
UNESP	Universidade Estadual Paulista
V	Voltagem
v/v	Volume/Volume
WB	<i>Western Blotting</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de sensibilização na doença alérgica .....	3
Figura 2 – Mecanismo de fase efetora na doença alérgica .....	4
Figura 3 – Antígenos alimentares atravessam o epitélio intestinal para induzir tolerância ou provocar alergia .....	10
Figura 4 – Classificação das proteínas potencialmente mais alergênicas .....	44
Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% dos extratos de mandioca, frutas e vegetais que apresentaram positividade no teste cutâneo .....	47
Figura 6 – <i>Western Blotting</i> 1D com os dez indivíduos (1-10) alérgicos com extrato total de mandioca.....	48
Figura 7 – <i>Western Blotting</i> 1D com o extrato das frutas e vegetais para os indivíduos positivos no prick to prick agrupados por indivíduo.....	49
Figura 8 – <i>Western Blotting</i> 1D com o extrato das frutas e vegetais que os indivíduos foram positivos no <i>prick to prick</i> agrupados por alimento .....	52
Figura 9 – Eletroforese 2D SDS - PAGE em gel de acrilamida 12% do extrato de mandioca.....	53
Figura 10 – Eletroforese e <i>immunoblotting</i> 2D SDS - PAGE com extrato de mandioca.....	54
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% com os clones transformados em <i>E. coli</i> .....	56
Figura 12 – Eletroforese e <i>immunoblotting</i> com FBA recombinante.....	57
Figura 13 – <i>Western Blotting</i> com proteína recombinante fructose bifosfato aldolase (FBA) com indivíduos alérgicos a mandioca (1-10).....	58
Figura 14 – Simulação gástrica com pepsina com a proteína recombinante fructose bifosfato aldolase em gel SDS - PAGE 12% acrilamida.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais alérgenos do látex que apresentam reatividade cruzada com alimentos.....	24
Tabela 2 – Sintomas clínicos e teste <i>prick to prick</i> para mandica dos indivíduos selecionados para o estudo .....	32
Tabela 3 – Resultados das análises do banco de alérgenos AllerCatPro 2.0 agrupados por organismo.....	42
Tabela 4 – Teste cutâneo para frutas e vegetais que os indivíduos relataram sintomas clínicos.....	45
Tabela 5 – Resultados de ImmunoCAP para látex e seus alérgenos específicos e <i>prick to prick</i> com luva de látex .....	46
Tabela 6 – Identificação das proteínas reativas a IgE no WB 2D SDS-PAGE e seus respectivos alérgenos já descritos e relatos na literatura de reatividade IgE.....	55

## RESUMO

Ventura AKRM. *Identificação de novos alérgenos de mandioca (Manihot esculenta)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A alergia alimentar é uma doença de hipersensibilidade do tipo I que vem crescendo a cada ano principalmente em países em desenvolvimento. Estima-se que mais de 220 milhões de pessoas no mundo sofrem com ela. A situação foi agravada, principalmente, pelo aumento do consumo de alimentos industrializados que, muitas vezes, possuem rotulagem inadequada. A identificação dos alérgenos envolvidos e a elucidação de suas propriedades intrínsecas e padrões de reatividade cruzada têm auxiliado no entendimento dos mecanismos de sensibilização e em como os perfis de alérgenos determinam os diferentes fenótipos. O diagnóstico molecular é essencial para orientar o manejo e a avaliação de risco desses pacientes. A mandioca (*Manihot esculenta*) é um alimento amplamente consumido na América do Sul, África e Ásia e, além de poder ser consumido cozido ou frito, também pode ser encontrado em outros alimentos como farinhas e amido além de diversos outros alimentos. Pertencente a família das Euforbiáceas, mesma família do látex (*Hevea brasiliensis*), esta raiz pode causar reações alérgicas com sintomas que variam de leves a graves, tendo um alérgeno descrito, *Man e 5*, que reage cruzadamente com o alérgeno *Hev b 5* do látex. O objetivo deste estudo foi a caracterização do proteoma do extrato de mandioca e identificação das proteínas responsáveis pela sensibilização de pacientes alérgicos a este alimento. Para isso, foi utilizado uma abordagem de *shotgun* por LC-MS/MS, 1D e 2D-SDS-PAGE seguidos por *immunoblotting*. Foram identificadas 474 proteínas das quais 51 têm potencial alergênico, segundo predição *in silico*. Ao avaliar a reatividade dos indivíduos à mandioca frente a diferentes frutas para as quais relataram alergia, algumas bandas IgE-reativas foram visualizadas no WB-1D em regiões que poderiam ser alérgenos já descritos. Destacamos, *Pers a 1* (abacate), *Act d 1*, *Act d 7* (kiwi) e *Mus a 2* (banana), para as quais foram identificadas proteínas homólogas no extrato total que podem ser possíveis novos alérgenos. Seis proteínas foram reconhecidas por IgE no WB-2D: *alpha-1,4 glucan phosphorylase*, *peptidase\_S9*, *cytosol\_AP* e três homólogos já identificados em outras fontes inclusive em látex: *ATP synthase*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e *fructose-bisphosphate aldolase* (FBA). Desses, quatro estão sendo descritos como alérgenos de mandioca pela primeira vez neste estudo. A proteína FBA foi produzida na forma recombinante em células Expi293 e testada por immunoblotting com o soro de 10 indivíduos com alergia à mandioca confirmada, sendo reconhecida por 80% dos indivíduos testados. A molécula recombinante mostrou-se estável à digestão por pepsina e foi reconhecida por indivíduos sem histórico de alergia nem sensibilização ao látex. Este é o primeiro relato de uma proteína IgE-reativa presente na mandioca que não apresenta reatividade cruzada com látex. Além desta, identificamos outros quatro potenciais alérgenos com reatividade cruzada com frutas. A molécula obtida neste estudo pode ser importante para testes diagnósticos *in vivo* ou, futuramente, em protocolos de dessensibilização, em que o uso de uma molécula isolada, pode produzir resultados mais eficazes quando comparados com extratos, evitando sensibilização secundária.

Descritores: Hipersensibilidade Alimentar; Alérgenos; *Western Blotting*; Proteoma; *Manihot*; Frutose-Bifosfato Aldolase

## ABSTRACT

Ventura AKRM. *Identification of new cassava allergens (Manihot esculenta)* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Food allergy is a type I hypersensitivity disease that is growing every year mainly in developing countries. It is estimated that more than 220 million people in the world suffer from it. The situation was aggravated mainly by the increase in the consumption of processed foods that often have inadequate labeling. The identification of the allergens involved and the elucidation of their intrinsic properties and cross-reactivity patterns has helped in the understanding of the mechanisms of sensitization and in how the allergen profiles determine the different phenotypes. Molecular diagnosis is essential in guiding the management and risk assessment of these patients. Cassava (*Manihot esculenta*) is a food widely consumed in South America, Africa, and Asia. Its consumption can be cooked or fried, it can also be found in other foods, such as flour and starch, and in addition to several other foods. It belongs to the *Euphorbiaceae* family, the same family as the latex (*Hevea brasiliensis*). This root can cause allergic reactions with symptoms that range from mild to severe. The objective of this study was the proteome characterization of manioc extract and identification of cassava proteins responsible for the sensitization of patients allergic to this food. For this, it was used a LC-MS/MS shotgun analysis, 1D and 2D-SDS-PAGE followed by immunoblotting. From that, 474 proteins were identified, of which 51 were considered potentially allergenic using an in silico approach. When evaluating the reactivity to cassava compared to different fruits to which the individuals reported allergy, some IgE-reactive bands appeared in the WB-1D in the same regions of allergens already described. Here, we highlight *Pers a 1* (avocado), *Act d 1*, *Act d 7* (kiwi) and *Mus a 2* (banana), for which homologous proteins were identified in the total extract and that could be possible new allergens. Six proteins were identified, alpha-1,4 glucan phosphorylase, peptidase\_S9, cytosol\_AP and three homologs already identified in other sources and, also in latex ATP synthase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and fructose-bisphosphate aldolase (FBA). Of these, four are being described as cassava allergens for the first time in this study. The FBA recombinant was produced in Expi293 cells and tested by immunoblotting with the serum of 10 individuals with confirmed cassava allergy, being recognized by 80% of tested sera. The recombinant molecule obtained in this study is resistant to pepsin digestion and was recognized by individuals with no history of latex allergy or sensitization. This is the first report of a cassava IgE-reactive molecule without cross reactivity with latex. It may be important for in vivo diagnostic tests, or future use in desensitization protocols, where the use of an isolated molecule might produce more effective results compared to extracts, avoiding secondary sensitization.

Descriptors: Food Hypersensitivity; Allergens; Blotting; Proteome; *Manihot*; Fructose-Bisphosphate Aldolase

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇAS ALÉRGICAS

As doenças alérgicas estão entre as doenças não transmissíveis mais comuns em todo o mundo e, apesar de todo o progresso científico e do desenvolvimento de novos tratamentos, essas doenças continuam crescendo em prevalência, espectro e gravidade. Nos últimos 150 anos, as alergias surgiram de forma muito rápida e sua prevalência segue aumentando<sup>1,2</sup>.

As alergias representam um conjunto de distúrbios mediados por respostas imunes inatas e adaptativas, juntamente com células epiteliais causando hipersensibilidade imunológica a moléculas ambientais não próprias e inicialmente inofensivas. As principais incluem asma, dermatite atópica, rinite alérgica, conjuntivite, rinossinusite crônica e alergia alimentar, afetando mais de 25% da população em países industrializados. Atualmente, mais de 30% das crianças são alérgicas, cerca de 10% delas sofrem de asma e rinite alérgica e de 5 a 7% desenvolveram alergia alimentar<sup>2,3</sup>.

Embora a predisposição genética seja um fator que contribui para a suscetibilidade das alergias, o surgimento dessas doenças tem se desenvolvido rápido demais para ser explicado por mudanças genéticas na população, implicando assim em mudanças ambientais ou de estilo de vida. A hipótese da higiene, propõe que a falta de exposição precoce a microorganismos altera a ativação do sistema imunológico no início da vida e, conseqüentemente, aumenta a suscetibilidade às doenças atópicas. Desde a proposta original de Strachan em 1989, a hipótese se expandiu para incluir outros fatores adicionais importantes como tipo de parto, exposição a antibióticos, animais domésticos, entre outros<sup>1,4,5</sup>. Vários outros fatores ambientais, incluindo poluição, mudanças climáticas, redução da biodiversidade, urbanização, mudança no estilo de vida e nos hábitos alimentares, têm sido atribuídos ao importante aumento de casos alérgicos<sup>3</sup>.

## 1.2 MECANISMOS DA ALERGIA

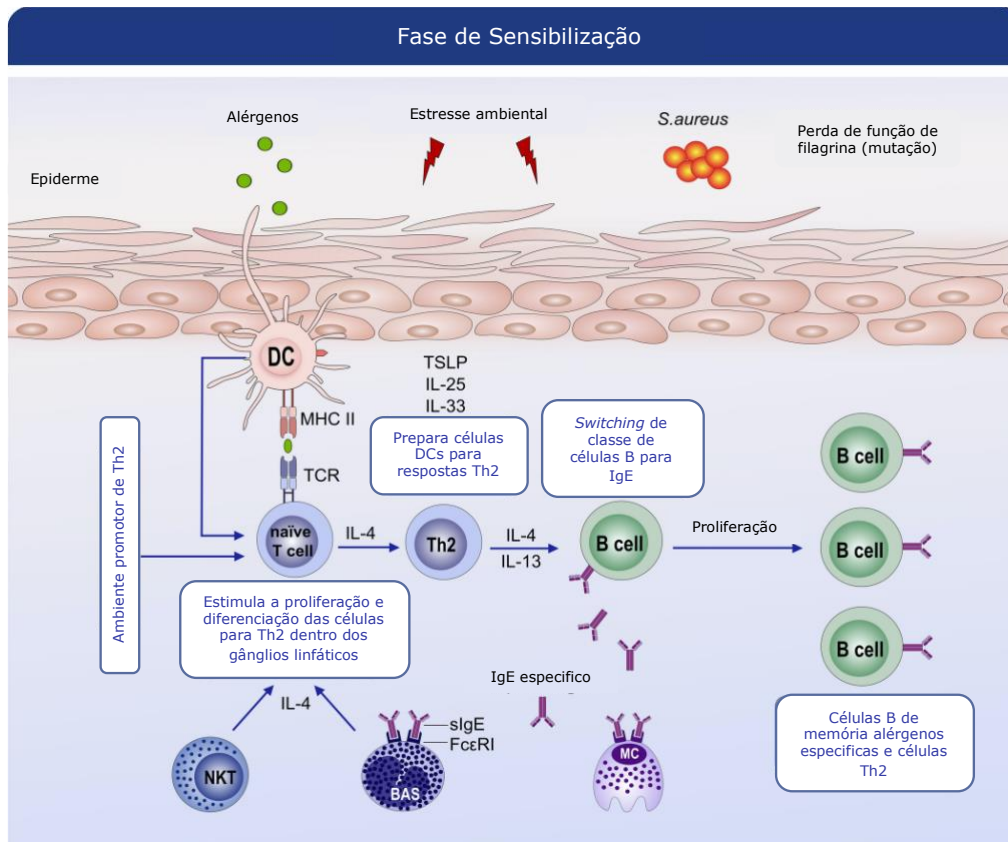
O sistema imune desempenha um papel crucial na proteção do corpo contra patógenos, podendo desencadear, por vezes, uma resposta exacerbada. Essa resposta exacerbada, desencadeada pela interação do sistema imune com um antígeno, é chamada de reação de hipersensibilidade. De acordo com Coombs e Gell, as reações de hipersensibilidade são classificadas em quatro tipos: tipo I, que se refere a uma reação mediada por imunoglobulinas do tipo E (IgE); tipo II, que se trata de uma reação citotóxica mediada por anticorpos IgG ou IgM; tipo III, que envolve uma reação mediada por imunocomplexos; e tipo IV, que é caracterizada por uma reação tardia mediada pela resposta celular<sup>6</sup>. As reações de tipos I, II e III são consideradas reações de hipersensibilidade imediata, porque ocorrem dentro de 24 horas, e a reação tipo IV é considerada uma reação de hipersensibilidade tardia, pois geralmente acontece mais de 12 horas após a exposição ao alérgeno, com tempo máximo de reação entre 48 e 72 horas.

Um sistema imunológico desregulado por essa reação de hipersensibilidade, desenvolve, principalmente, a resposta pró-inflamatória mediada por células T auxiliares tipo 2 (Th2, do inglês – T Helper cell type 2) que acarreta na formação de anticorpos IgE específicos contra alérgenos ambientais e alimentares, bem como a produção de várias citocinas, incluindo interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-31, IL-33 e linfopoietina estromal tímica (TSLP, do inglês – *Thymic Stromal Lymphopoietin*)<sup>7</sup>.

As reações de hipersensibilidade podem ser divididas em duas fases: sensibilização e efetora. Durante a fase de sensibilização, as células dendríticas (DCs, do inglês – *Dendritic Cells*) da mucosa capturam na pele, vias aéreas ou intestino, processam e transportam os alérgenos para os linfonodos mais próximos, a fim de estimular a maturação de células Th2 alérgeno-específicas em um processo dependente da IL-4. As citocinas produzidas por células endoteliais após estímulo ambiental resultam na polarização de DCs para um perfil pró-inflamatório. Assim, a expansão clonal e a ativação de células Th2 alérgeno-específicas produzem IL-4 e IL-13 que favorecem o *switch* de classe dos anticorpos produzidos pela célula B para IgE. Consequentemente, estas IgEs específicas se ligam à superfície de células efetoras (mastócitos e basófilos) através do receptor de alta afinidade à IgE (FcεRI), tornando o



indivíduo sensibilizado. Nessa fase, ainda não há presença de sintomas clínicos (Figura 1)<sup>7,8</sup>.



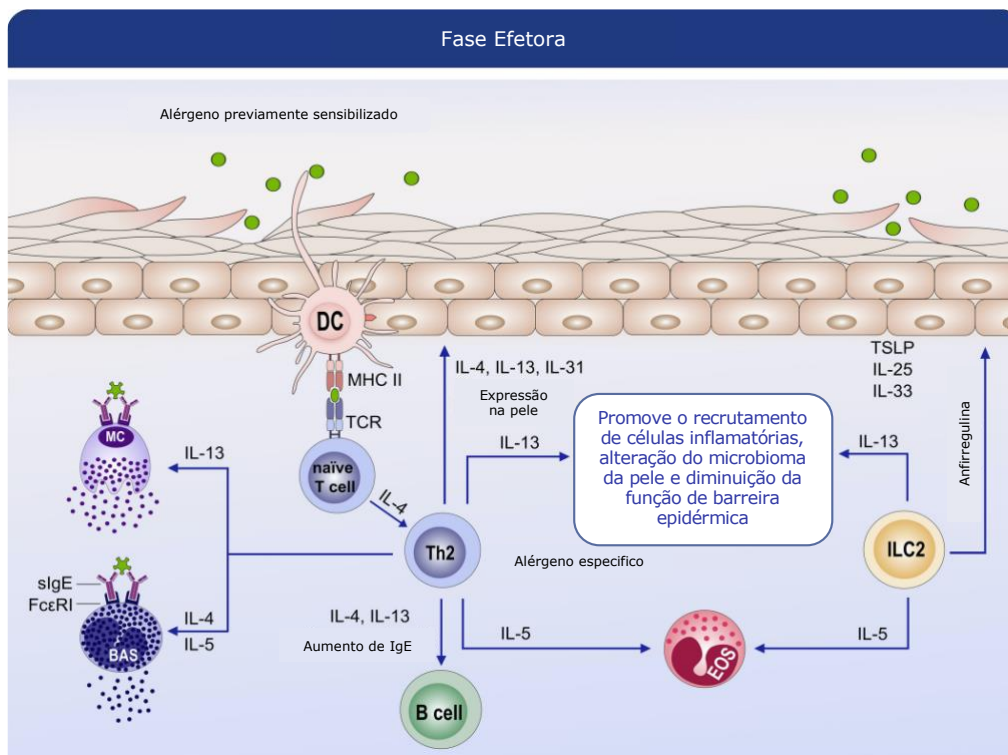
**Figura 1 – Mecanismo de sensibilização na doença alérgica**

FONTE: Adaptado de Brough, H. A<sup>7</sup>.

NOTA: Durante a fase de sensibilização alérgica, no cenário de uma barreira prejudicada, subconjuntos específicos de células dendríticas residentes (DCs) capturam alérgenos na pele e transportam os alérgenos para os gânglios linfáticos, onde são processados e apresentados às células T CD4<sup>+</sup> *naive*. Dentro dos gânglios linfáticos, a presença de IL-4 e IL-13 favorece a mudança de isotipo dos anticorpos produzidos pelas células B, gerando células produtoras de IgE específicos que se diferenciam em células plasmáticas e produzem grandes quantidades de anticorpos contra os alérgenos (sIgE, do inglês specific IgE). O sIgE se liga ao receptor FcεRI de alta afinidade na superfície dos mastócitos e basófilos. Durante essa fase, um *pool* de células B de memória específicas e de células T helper 2 CD4<sup>+</sup> específicas são gerados.

A fase efetora é iniciada nos indivíduos previamente sensibilizados, mediante nova exposição ao alérgeno, porém, pode ocorrer na próxima ou na enésima exposição. Importante salientar que alguns indivíduos podem ser sensibilizados sem nunca desenvolver a fase efetora, ou seja, não desenvolvem uma resposta alérgica<sup>9</sup>. Nesta fase, ocorre a ligação cruzada desse alérgeno com as IgEs específicas ancoradas à superfície de basófilos e mastócitos, levando à liberação imediata de mediadores químicos como histamina, proteases, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, responsáveis pelos

sintomas da fase imediata da reação alérgica, que acontece em pouco tempo após exposição ao alérgeno. O acúmulo desses mediadores e a ativação de células Th2 alérgeno-específicas e células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2, do inglês *Innate Lymphoid Cell type 2*), ativadas por citocinas derivadas de células epiteliais que produzem IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, desempenham um papel fundamental na manutenção dos níveis de IgE específicas, na eosinofilia e no recrutamento de células pró-inflamatórias para tecidos inflamados. Isso desencadeia a produção de muco e inflamação, levando a dano tecidual. A inflamação crônica, que caracteriza a fase tardia da alergia, ocorre entre 8 a 12 horas após exposição ao alérgeno. Evidências recentes sugerem que IL-13 é a principal citocina que impulsiona a inflamação periférica em dermatite atópica e superexpressa localmente, enquanto IL-4 possui um efeito mais central (Figura 2)<sup>7,8,10</sup>.



**Figura 2 – Mecanismo de fase efetora na doença alérgica**

FONTE: Adaptado de Brough, H. A<sup>7</sup>.

NOTA: Durante essa fase, encontros subsequentes com um alérgeno previamente sensibilizado levam à ligação do alérgeno à IgE e ativação de basófilos e mastócitos. A degranulação de mastócitos e basófilos desencadeia a liberação de mediadores pró-inflamatórios que causam os sintomas clínicos da reação alérgica imediata, e o acúmulo desses mediadores, bem como a ativação de células T auxiliares do tipo 2 (Th2, do inglês – T Helper cells type 2) e de células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2, do inglês *Innate Lymphoid Cell type 2*) impulsionam a fase tardia subsequente que leva à inflamação e ao dano tecidual.

A reação de hipersensibilidade do tipo I envolve a participação de células Th2, ILC2, células B, uma pequena fração de células *natural killer* (NK) e células T *natural killer* (NK-T) secretoras de IL-4, basófilos, eosinófilos e mastócitos e suas principais citocinas<sup>11</sup>. As principais manifestações clínicas desse tipo de reação de hipersensibilidade incluem asma, dermatite atópica e rinosinusite<sup>8</sup>.

A reação de hipersensibilidade do tipo II acontece normalmente de 5 a 8 horas após o segundo contato com o alérgeno, sendo mediadas por anticorpos IgG e IgM que irão se ligar na superfície de células ou na matriz celular, sendo, por essa razão, geralmente associada à uma manifestação clínica local. A reação de tipo II pode envolver três mecanismos de ação. O primeiro mecanismo envolve a ligação de anticorpos aos antígenos ligados à superfície celular levando à opsonização direta dessas células diretamente ou à ativação da via clássica do sistema complemento. Esse mecanismo ocorre, por exemplo, na anemia hemolítica autoimune. No segundo mecanismo, os anticorpos ligados ao tecido favorecem a ativação de neutrófilos e macrófagos levando a uma lesão tecidual e promovendo inflamação e fagocitose das células endoteliais. Esse mecanismo é evidenciado em glomerulonefrites mediadas por anticorpos. O terceiro mecanismo envolve a ligação direta de anticorpos aos receptores ou à proteínas celulares, causando disfuncionalidade, porém sem gerar inflamação ou dano tecidual<sup>10,12,13</sup>.

A reação de hipersensibilidade do tipo III é desencadeada entre 2 a 8 horas após o segundo contato com o alérgeno e tem como alvos antígenos solúveis, como por exemplo as vacinas, o soro heterólogo e os anticorpos monoclonais. As principais patologias decorrentes desse tipo de reação de hipersensibilidade incluem a Reação de Arthus e a doença do soro. O seu mecanismo efetor é o processo de inflamação desencadeado por uma resposta imune humoral ao antígeno com produção de anticorpos específicos e formação de imunocomplexos que ativam o sistema complemento<sup>10,13</sup>.

A reação de hipersensibilidade tipo IV é mediada por células T que provocam uma reação inflamatória contra antígenos exógenos ou endógenos. Em certas situações, outras células como monócitos, eosinófilos e neutrófilos também podem estar envolvidas. Após a exposição ao antígeno, ocorre uma resposta inflamatória local inicial que atrai os leucócitos. O antígeno capturado por macrófagos e monócitos é apresentado às células T que se tornam sensibilizadas e ativadas. Essas células liberam citocinas e quimiocinas que podem causar danos nos tecidos. Exemplos de doenças resultantes de

reações de hipersensibilidade do tipo IV incluem a dermatite de contato e a hipersensibilidade a drogas<sup>14</sup>.

Dependendo do tecido afetado, as reações de hipersensibilidade apresentam manifestações clínicas diferentes. Os locais mais comumente acometidos são a pele (urticária, angioedema) e os sistemas gastrointestinal (dor abdominal, vômitos, diarreia) e cardiopulmonar (aumento de batimentos cardíacos, hipotensão, tosse). A forma mais grave da reação alérgica é a anafilaxia, que é caracterizada pelo acometimento de pelo menos dois sistemas, em geral a pele e mais um<sup>8</sup>.

A inflamação eosinofílica e a hipersensibilidade mediada por IgE geralmente acompanham a inflamação alérgica e são induzidas por células Th2 antígeno-específicas<sup>9</sup>. De fato, já está bem estabelecido que as células T específicas para alérgenos desempenham um papel importante na inflamação alérgica e que a indução de células T reguladoras (Tregs) específicas ou a eliminação de células Th2 pode ser um pré-requisito para a indução de tolerância. Entretanto, a avaliação de reatividade cruzada em células T ainda é pouco relatada<sup>10</sup>.

O termo antígeno refere-se à capacidade de certas moléculas de induzir resposta imune, seja por meio da interação com anticorpos ou com receptores de células T. Quando uma resposta IgE é gerada contra um antígeno, este se qualifica como alérgeno<sup>15</sup>. Os exemplos mais comuns de fontes de alérgenos são: ácaros, epitélio de animais, alimentos, fungos, pólenes, venenos de insetos e medicamentos<sup>10</sup>.

A IgE é o anticorpo menos abundante na circulação. Sua concentração no plasma é aproximadamente 105 vezes menor do que a de IgG (100 ng/ml vs 10 mg/ml). Além de estar presente em concentrações baixas, a IgE tem uma meia-vida curta, inferior a 1 dia, enquanto a da IgG é de aproximadamente 3 semanas. No entanto, a maior parte da IgE do corpo é encontrada ligada às células, devido à alta afinidade dela pelo FcεRI. A IgE se mantém permanentemente ligada ao FcεRI até o momento em que é internalizada, o que faz com que a sua meia-vida tecidual seja da ordem de semanas a meses<sup>12</sup>.

Na alergia alimentar (AA), as análises de quaisquer efeitos protetores da IgG contra a progressão da reação se concentraram no isotipo IgG4. Um papel protetor para IgG4 já havia sido estabelecido como um biomarcador significativo de eficácia na imunoterapia subcutânea alérgeno específica (SCIT, do inglês – *SubCutaneous ImmunoTherapy*). Os achados de IgG4 na SCIT levaram a um maior interesse nesta

subclasse em estudos de AA, sendo a única subclasse de IgG para a qual testes específicos foram desenvolvidos comercialmente. IgG4 é o isotipo menos abundante de IgG no soro humano, muitas vezes representando apenas 5% do total, porém, com a exposição crônica ao antígeno, essa proporção pode aumentar. Assim como a IgE, a IgG4 é induzida durante as respostas imunes Th2 sob a ação de IL-4 e IL-13 nas células B. O conceito de uma resposta Th2 “modificada” evoluiu para descrever um cenário em que a IL-10 está presente juntamente com a IL-4 e, sob influência de IgE, promovem a troca de classe para IgG4<sup>16</sup>.

IgG4 é a única subclasse de IgG que não medeia funções efetoras comuns de IgG, como citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos ou dependente do complemento. Esses anticorpos possuem a capacidade única de sofrer troca do braço que se liga ao antígeno (Fab, do inglês – *Fragment antigen-binding*). Nesse processo, as cadeias pesadas de anticorpos IgG4 podem se separar em duas metades, cada metade consistindo em uma cadeia pesada e uma cadeia leve. As metades dos anticorpos originários de diferentes IgG4s podem se combinar para formar anticorpos biespecíficos. Este rearranjo de regiões Fab permite que uma única IgG4 reconheça dois epítomos em um único alérgeno, aumentando a avidéz de ligação geral e facilitando o *crosslinking*. Devido à sua presença no soro em concentrações mais altas do que a IgE, sua habilidade de reconhecer mais epítomos e sua capacidade limitada de formar complexos imunes e mediar a função efetora, foi proposto que a IgG4 pode ser adequada para funcionar como um anticorpo bloqueador, interceptando alérgenos antes mesmo que eles possam ser ativados pela IgE ligada na superfície das células efetoras<sup>16</sup>.

### 1.3 ALERGIA ALIMENTAR

Alergia alimentar é caracterizada como uma reação imunológica adversa reprodutível a um determinado componente do alimento, na grande maioria das vezes proteico, desencadeando um amplo espectro de distúrbios clínico-patológicos<sup>13</sup>. A quebra da tolerância imunológica e clínica a um alimento ingerido é o gatilho para AA e isso resulta em reações mediadas principalmente por uma resposta de hipersensibilidade do tipo I, que pode ou não ser mediada por anticorpos IgE ou por mecanismo misto<sup>10,17,18</sup>.

Embora qualquer alimento possa potencialmente desencadear sintomas alérgicos, 90% das reações são desencadeadas por nove principais alimentos que

incluem: leite de vaca, ovo de galinha (sendo esses dois primeiros mais comuns em crianças), peixes, frutos do mar, soja, trigo, nozes, amendoim<sup>6</sup> e gergelim, o qual foi recentemente adicionado como um dos mais comuns causadores de AA<sup>7</sup>. A importância de cada um deles varia de acordo com o país ou região. No Brasil, por exemplo, as AA relacionadas ao amendoim não tem tanta importância quanto aquelas associadas à ingestão do milho<sup>19</sup>. O conhecimento sobre os alérgenos de maior importância em cada região se faz importante para melhorar a informação dos rótulos de produtos alimentícios embalados<sup>20</sup>.

Uma maior estabilidade aumenta o tempo de permanência dos alérgenos no ambiente, intensificando ainda mais a probabilidade de exposição. Aeroalérgenos devem suportar desidratação, exposição oxidativa e a radiação ultravioleta, enquanto no contexto da alergia alimentar devem ser considerados os efeitos da digestão gástrica e da preparação dos alimentos<sup>21</sup>.

No passado, as alergias e as intolerâncias alimentares eram frequentemente confundidas entre si devido à sua semelhança nas manifestações clínicas. Além disso, o mesmo alimento pode ser responsável por causar intolerância e alergia, o que acaba dificultando o diagnóstico<sup>22</sup>. Em termos fisiológicos, a diferença entre essas patologias está em que a intolerância alimentar se trata de uma reação não imune desencadeada por mecanismos tóxicos, farmacológicos ou metabólicos<sup>23</sup>.

As manifestações clínicas da alergia alimentar são muito variáveis, podendo afetar os sistemas respiratório, cardiovascular, gastrintestinal e/ou nervoso. Quando se manifesta de forma mais leve, os sintomas podem ser urticária, coceira, dor abdominal e tosse. Em sua forma grave, pode acometer mais de um sistema podendo levar a um choque anafilático e culminar em óbito<sup>24-26</sup>.

A pele apresenta boa parte das manifestações clínicas incluindo prurido e urticária, além de ser um importante local de sensibilização primária a alérgenos alimentares, de modo que indivíduos com dermatite atópica são considerados mais suscetíveis ao desenvolvimento desse tipo de alergia<sup>24-26</sup>.

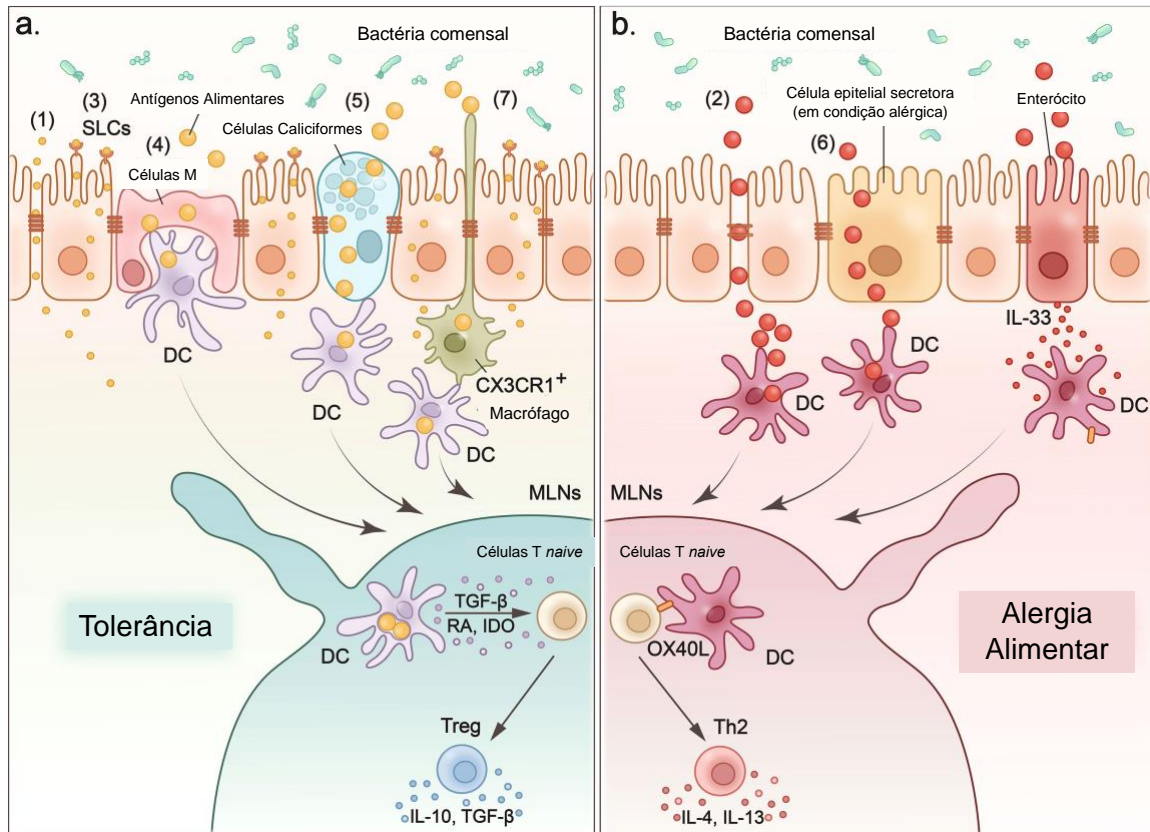
Como é comum em doenças crônicas, a expressão de alergia alimentar é influenciada por interações genéticas e ambientais, além de efeitos epigenéticos. Diversos fatores de risco podem contribuir para o surgimento de alergia ou sensibilização alimentar, dentre eles estão: os riscos imutáveis, que incluem sexo biológico (havendo uma predominância de casos de sexo masculino em crianças),

raça/etnia (tendo-se descrito um risco aumentado entre crianças asiáticas e negras em comparação com crianças caucasianas) e genético com a presença de associações familiares, associação com genótipos do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês – *Human Leukocyte Antigen*) e genes específicos; e fatores de risco potencial, como na dermatite atópica, hipótese da higiene, influência do microbioma, insuficiência de vitamina D, consumo reduzido de ácidos graxos ômega-3-poliinsaturados e antioxidantes, aumento do uso de antiácidos (influenciando na digestibilidade de alérgenos) e obesidade (estado inflamatório constante)<sup>27</sup>.

### 1.3.1 Alergia Alimentar Mediada por IgE

As AAs mediadas por IgE estão associadas ao risco maior de reações graves ou até mesmo fatais, e, por essa razão, é o tipo de reação mais bem caracterizado. Em muitos casos, a reação de hipersensibilidade, bem como os sintomas clínicos se desenvolvem em poucos minutos ou em até poucas horas após a ingestão do alimento<sup>28,29</sup>.

Esse tipo de AA ocorre como resultado de uma perda de integridade nos principais componentes imunes que mantêm um estado de tolerância e impedem que os antígenos alimentares benignos sejam reconhecidos como patógenos. Mais especificamente, a tolerância oral aos alimentos se define com o cruzamento do antígeno alimentar através da barreira mucosa do trato gastrointestinal, processamento pelas células dendríticas em um estado não ativado e a indução de citocinas supressoras, como a IL-10<sup>28</sup>, como pode ser visto na figura 3.



**Figura 3 – Antígenos alimentares atravessam o epitélio intestinal para induzir tolerância ou provocar alergia**

FONTE: Adaptado de Xiong, Y et al.<sup>30</sup>

NOTA: (1) Moléculas pequenas, como eletrólitos e água, entram no subepitélio por vias paracelulares. (2) A degradação das junções aumenta a permeabilidade da via paracelular, levando a uma entrada não seletiva e descontrolada de macromoléculas no subepitélio intestinal contribuindo para o processo de sensibilização nas alergias alimentares. (3) Moléculas pequenas, são transportadas através do epitélio por transportadores de borda em escova apical nos enterócitos. (4) As células M (importantes no processo de transferir antígenos) coletam os antígenos alimentares e os apresentam às células dendríticas (DCs, do inglês – *Dendritic Cells*). (5) As células caliciformes formam junções GAP entre elas para assim envolverem antígenos luminiais (antígenos alimentares e microbianos) em vesículas internas semelhantes a sacos e transportá-los para DCs. (6) Em modelos de camundongos com alergia alimentar, as células epiteliais secretoras funcionam como condutores para permitir o transporte de antígenos alimentares através do epitélio do intestino delgado e induzirem uma reação anafilática por alimentos. (7) Os macrófagos CX3CR1+ (especializados em captação de antígenos) dependem da expressão de CX3CR1 para formar dendritos para apresentar antígenos com eficiência no lúmen intestinal sem interromper as junções entre as células. Esses macrófagos transferem antígenos que capturaram para CD103+ DC. (A) Quando os antígenos alimentares entram no subepitélio intestinal pelas vias acima, eles são adquiridos e processados pelas DCs. Em seguida, as DCs migram para os linfonodos mesentéricos, onde apresentam os antígenos dos alimentos processados e induzem tolerância ou alergia alimentar. Para induzir a tolerância oral, as DCs secretam interleucina-10 (IL-10), fator transformador de crescimento-β (TGF-β, do inglês – *Transforming Growth Factor Beta*) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) para induzir células T reguladoras (Tregs) e manter a tolerância. (B) No caso de alergia, antígenos orais e adjuvantes estimulam a expressão de IL-33 nas células epiteliais intestinais, que, por sua vez, regula positivamente a expressão da molécula coestimuladora OX40L nas DCs, o que promove a resposta pró-inflamatória de células T auxiliaadoras do tipo 2 (Th2, do inglês – *T Helper cell type 2*) nos linfonodos mesentéricos, ocasionando alergias alimentares mais graves.



O processo de sensibilização envolvendo IgE pode acontecer quando há presença de uma IgE específica para determinado alimento no soro, podendo essa molécula ser um precursor para o desenvolvimento de alergia alimentar clínica. Os mecanismos imunológicos que levam à sensibilização se iniciam a partir do primeiro contato com o alérgeno<sup>28</sup>. A perturbação da tolerância oral promove a sensibilização ao alérgeno, caracterizada por respostas imunes Th2 dominantes e mudança de classe de células B para IgE. A inflamação causada por Th2 está associada aos níveis aumentados de IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 induz proliferação de Th2, troca de isótipos de células B e desenvolvimento de mastócitos, a IL-5 impulsiona o crescimento, maturação, recrutamento e ativação de eosinófilos e a IL-13 induz a síntese de IgE, recrutamento de eosinófilos e basófilos e produção e excreção de muco pelas células epiteliais<sup>31</sup>.

A AA é comumente associada à dermatite atópica, implicando a pele como uma possível via de sensibilização aos alérgenos alimentares. Mutações no gene filagrina, que codifica a proteína agregadora de filamentos epidérmicos (essencial para manter a integridade da pele), estão associadas à diminuição da função de barreira dos queratinócitos. Outros danos à pele e adjuvantes microbianos como a enterotoxina B de estafilococos, podem também induzir uma resposta inflamatória inata da pele favorecendo o processo de sensibilização<sup>18,28,31</sup>.

Porém, a via respiratória também é responsável por causar a sensibilização na AA, visto que os aeroalérgenos inalados podem reagir de forma cruzada com antígenos alimentares, resultando em uma condição denominada como síndrome de alergia oral. Uma vez estabelecida a sensibilização por aeroalérgenos, a reexposição ao antígeno ou antígenos extremamente semelhantes, independente da via de exposição, pode desencadear sintomas clínicos. Como já descrito, uma vez produzida, a IgE específica ao alérgeno liga-se ao seu receptor de alta afinidade (FcεRI) na superfície dos mastócitos e basófilos, que poderão ser ativados na reexposição posterior ao antígeno ou seu semelhante. Na etapa de ativação, que ocorre nesse contato subsequente, essas células desgranulam, resultando na liberação de mediadores (histamina, triptase, fator ativador de plaquetas, prostaglandinas e leucotrienos) que podem levar às manifestações clínicas locais ou sistêmicas<sup>15</sup>.

### 1.3.2 Alergia Alimentar Mediada por Mecanismos Não IgE

Diferente do que acontece nas reações IgE mediadas, aquelas não mediadas por IgE são tipicamente crônicas e ocorrem tardiamente, com manifestações clínicas aparecendo horas ou até mesmo após semanas da ingestão do alimento contendo o alérgeno causador. Compreendem reações citotóxicas, por imunocomplexos e são mediadas por células<sup>32-34</sup>. São denominadas doenças gastrointestinais induzidas por alimentos não mediadas por anticorpos IgE (non-IgE-GI-Fas, do inglês – *non-IgE Gastrointestinal Food Allergies*) e são alergias alimentares ainda pouco compreendidas<sup>35</sup>.

Em comparação com as alergias alimentares mediadas por IgE, o diagnóstico das síndromes de hipersensibilidade alimentar não mediadas por IgE pode ser um desafio devido à falta de testes confirmatórios não invasivos para a maioria desses distúrbios. Muitas dessas síndromes são diagnosticadas com base na história clínica e são tratadas empiricamente pela retirada do alimento da dieta<sup>34</sup>.

A hipersensibilidade alimentar não mediada por IgE abrange um amplo espectro de distúrbios, incluindo Síndrome de Enterocolite Induzida por Proteína Alimentar (FPIES, do inglês – *Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome*), Proctocolite Alérgica (AP, do inglês – *Allergic Proctocolitis*), Enteropatia Induzida por Proteína Alimentar (FPE, do inglês – *Food Protein-Induced Enteropathy*), Doença Celíaca, Síndrome de Heiner (hemossiderose) e Anemia por Deficiência de Ferro Induzida pela Proteína do Leite de Vaca, sendo as duas últimas extremamente raras<sup>34</sup>.

A FPIES é considerada a mais grave dentre as alergias não mediadas por IgE geralmente ocorrendo em lactentes jovens. Caracteriza-se por afetar todo o trato gastrointestinal, tendo como manifestações clínicas vômitos profusos, diarreia e déficit de crescimento. Embora sua fisiopatologia não seja bem compreendida, presume-se que os alérgenos alimentares podem ativar as células T no revestimento epitelial intestinal, resultando em inflamação local e, com isso, o aumento da permeabilidade intestinal. No entanto, o papel das células T tem sido questionado em vários estudos e mais investigações são necessárias para determinar os mecanismos exatos envolvidos na patogênese desse distúrbio. Os principais alimentos desencadeadores são leite de vaca e leite de soja em crianças entre 6 a 12 meses de vida<sup>34</sup>.

A AP é a mais leve das alergias não mediadas por IgE. É detectada em bebês aparentemente saudáveis, mas que apresentam manchas visíveis ou estrias de sangue misturadas com muco nas fezes. Esses sintomas geralmente desaparecem com a eliminação do alimento alergênico da dieta. A AP afeta predominantemente o reto sigmoidéide. Embora os mecanismos exatos sejam desconhecidos, acredita-se que resulte da ingestão materna de um alérgeno (geralmente leite de vaca) que é passado pelo leite materno em uma forma que pode ser reconhecida imunologicamente. Outros alimentos já foram descritos como causadores de resposta imune e incluem proteínas presentes na soja, ovo, milho, carne, peixe, maçã, cenoura, trigo e gergelim<sup>34</sup>.

A FPE é uma síndrome incomum de lesão do intestino delgado com má absorção semelhante à observada na doença celíaca, embora menos grave. É caracterizada pela mucosa do intestino delgado anormal quando o leite de vaca está na dieta, o que é revertido pela exclusão do mesmo. Eosinófilos, células Th2 específicas e a produção localizada de IgE na mucosa do intestino delgado têm sido implicados na fisiopatologia da doença. Seus sintomas são diarreia prolongada nos primeiros 9 meses de vida. Outras proteínas alimentares encontradas na soja, trigo e ovo também foram associadas à FPE. Mais da metade dos bebês afetados também apresentam vômitos e déficit de crescimento e alguns apresentam distensão abdominal e saciedade precoce. As fezes sanguinolentas, no entanto, geralmente estão ausentes<sup>34</sup>.

No grupo das alergias por mecanismos mistos, a melhor caracterizada é a Esofagite Eosinofílica (EoE, do inglês – *Eosinophilic Esophagitis*). A EoE é descrita como uma doença crônica inflamatória caracterizada por disfunção esofágica e acúmulo de eosinófilos no esôfago que pode ocorrer com ou sem participação de IgE<sup>36,37</sup>. Alguns alimentos alergênicos como leite, trigo, ovo, leguminosas e carnes têm desempenhado um papel central na EoE, provavelmente pela ativação de células Th2<sup>33</sup>.

A EoE é um processo inflamatório crônico caracterizado por hiperplasia epitelial, análoga à patologia cutânea da dermatite atópica, mas bastante diferente da hipersensibilidade do tipo I mediada por IgE. A condição se apresenta com início gradual de refluxo gastroesofágico, disfagia (dificuldade de deglutição), aversão alimentar, infiltrados de mucosa predominantemente eosinofílica no esôfago e estenoses esofágicas (estreitamento anormal). É claramente impulsionado por alérgenos alimentares e as dietas de eliminação são benéficas. Embora muitos indivíduos com EoE possuam anticorpos IgE específicos para alimentos (e alguns apresentem

coexistência de reações alérgicas mediadas por IgE clássicas a outros alimentos), a correlação é pobre entre a presença desses anticorpos IgE e o processo inflamatório latente à EoE. Em modelos murinos, a doença pode ser induzida em animais deficientes em IgE<sup>24</sup>. Em humanos, achados da literatura mostraram respostas clínicas incompletas à terapia anti-IgE, como também correlações positivas entre níveis mais elevados de IgG4 e atividade da doença, sugerindo que os mecanismos relacionados à IgG podem ter papéis importantes na indução da resposta inflamatória da EoE<sup>25</sup>.

### 1.3.3 Síndrome da Alergia Oral

A maioria das alergias alimentares se manifesta nos primeiros dois anos de vida, mas o tipo de alérgeno causador afeta a história natural, bem como o risco de reações sistêmicas, sendo diferente quando comparada à alergia em adultos. As reações alérgicas ao leite de vaca e ao ovo, por exemplo, podem desaparecer naturalmente com o tempo, enquanto alergia a amendoim, nozes e frutos do mar tendem a ser mais persistentes, mantendo-se até a idade adulta. Por sua vez, a sensibilização à frutas pode aparecer mais tardiamente, desencadeadas por reatividade cruzada com pólenes, dando origem a manifestações clínicas características da síndrome de alergia oral (SAO)<sup>22</sup>.

A SAO acomete indivíduos com rinite alérgica que acabam produzindo moléculas de IgE específicas para epítomos derivados de pólen que apresentam reação cruzada com epítomos de proteínas de frutas ou vegetais. É um tipo de alergia alimentar com manifestações clínicas geralmente limitadas a orofaringe, causada por frutas e vegetais crus e castanhas. Os sintomas mais comuns são o prurido na boca e garganta, além de angioedema, que se iniciam imediatamente após contato com o alimento, podendo, em casos incomuns, ocorrer uma hora após a ingestão. Nesta síndrome, os indivíduos podem responder a diversos alimentos que apresentem reatividade cruzada com pólenes. Por exemplo, alérgicos ao pólen de bétula podem ter resposta clínica a cenoura, maçã, cereja, amendoim e castanhas, e alérgicos ao pólen de grama podem apresentar resposta clínica ao tomate, laranja, pêssigo e melão. Todos os indivíduos que são alérgicos a pólenes possuem SAO<sup>38,39</sup>.

#### 1.4 EPIDEMIOLOGIA DA ALERGIA ALIMENTAR

Os dados de prevalência de AA na literatura são bastante limitados visto que a obtenção destes não é uma tarefa simples, pois, além de não existir um padrão metodológico de estudo, mais de 160 alimentos são conhecidos por causarem AA, com taxas de prevalência variáveis por alimento específico e população afetada. Além disso, sendo os desafios alimentares duplo-cego controlado por placebo e o teste de provocação oral (TPO) as metodologias ainda consideradas como padrão ouro no diagnóstico das AA, a realização de estudos populacionais torna-se bastante dificultosa pelo fato desses métodos apresentarem riscos de reações graves e, por isso, necessitarem ser realizados em ambiente hospitalar.

Dessa forma, os dados de prevalência existentes são baseados em diagnósticos que levam em consideração a história clínica autorrelatada, visitas clínicas ou hospitalares devido a supostas reações, e/ou determinação de IgE específica para alérgenos por teste cutâneo (SPT, do inglês – *Skin Prick Test*) ou por dosagem de IgE sérica. Entretanto, esses parâmetros estão associados a altas taxas de falsos positivos, levando à superestimação dos dados. Estima-se que o autorrelato também supervaloriza as informações em até três vezes, pois estes também podem incluir intolerâncias alimentares ou toxicidade. Por exemplo, um estudo<sup>40</sup> demonstrou que 14% das famílias relataram alergia ao leite em seus bebês, mas esta alergia só foi confirmada em apenas 1,4%. Outros fatores como variações geográficas, efeitos da exposição à dieta, diferenças entre idade, raça e etnia também acabam influenciando os resultados<sup>27,41,42</sup>.

Apesar disso, nas últimas décadas, a alergia alimentar tem assumido uma prevalência e gravidade crescentes, sendo mais comum em crianças em comparação aos adultos<sup>27,43</sup>. Estima-se que mais de 220 milhões de pessoas em todo o mundo sofram desse tipo de alergia<sup>22</sup>, o que se tornou um grande problema de saúde pública, pois impacta negativamente a qualidade de vida das pessoas. Acredita-se que esse agravamento aconteceu, principalmente, pelo fato de a população ter aumentado o consumo de alimentos processados, já que a prevalência de AA se mostrou muito superior em países ocidentais, especialmente nas regiões mais industrializadas<sup>27,44</sup>.

As primeiras diretrizes para contenção dos casos de AA recomendaram evitar o alérgeno na dieta ou retardar a inclusão de alimentos alergênicos em lactentes, mas estudos posteriores não observaram benefícios nesta abordagem. De fato, estudos mais

recentes envolvendo intervenções dietéticas no início da vida mostraram que a introdução de alimentos alergênicos deve ser realizada nos primeiros 4 a 6 meses de vida<sup>45-47</sup>.

Na última década, as taxas de incidência de AA na China e na África atingiram valores semelhantes àsquelas observadas em países ocidentais, e o crescimento econômico desses países e a expansão da globalização apontam para um futuro aumento da prevalência de AA em diversas regiões do Oriente. Segundo Panjari e colaboradores (2016)<sup>48</sup>, crianças de origem asiática ou africana nascidas no Ocidente apresentam maior risco de desenvolver alergia alimentar do que crianças caucasianas, sugerindo a importância da interação genoma-ambiente-estilo de vida no desenvolvimento dessa patologia. Nesse mesmo estudo, foi observado que entre crianças de origem asiática nascidas na Austrália, a prevalência de alergia a nozes é muito alta, enquanto as crianças asiáticas que imigraram para a Austrália aos 5 anos de idade não apresentaram alergia, confirmando os impactos epigenéticos e ambientais no desenvolvimento da doença<sup>22,48</sup>.

O Brasil é o país da América Latina com mais artigos publicados relacionados a alergia alimentar<sup>19</sup>, mas os dados de prevalência ainda são escassos. Em 2013 foi publicado um estudo observacional transversal com 9.478 crianças que mostrou a prevalência de apenas 5,4% de casos de alergia ao leite de vaca, embora esse alimento seja considerado a causa mais comum de reações alérgicas alimentares no mundo<sup>44</sup>. Outros dois estudos também relataram taxas de prevalência mais baixas de AA associadas ao leite de vaca e identificaram uma prevalência importante de alergias associadas ao consumo de frutas, vegetais, carne suína, camarão e outros frutos do mar<sup>49</sup>. De fato, a alergia aos alimentos regionais tem se tornado cada vez mais comum, como é o caso da alergia à mandioca, tubérculo muito consumido em diversas regiões da América do Sul, que possui diversas proteínas que apresentam reações cruzadas com proteínas do látex<sup>50</sup>.

Os dados de prevalência das AAs são de extrema importância pois ajudam em questões de saúde pública como planejamento de fornecimento de recursos em locais mais afastados e a gestão e a avaliação da saúde considerando as particularidades de cada população<sup>51</sup>. Entretanto, a obtenção de dados de prevalência robustos e fidedignos depende da definição de testes diagnósticos mais precisos e específicos.

#### 1.4.1 Diagnóstico e Tratamento da Alergia Alimentar

Na avaliação diagnóstica das reações adversas aos alimentos, a história clínica tem papel fundamental. O seu valor depende muito da capacidade dos indivíduos de recordar dos sintomas e da habilidade do médico em diferenciar as manifestações causadas por hipersensibilidade alimentar daquelas relacionadas a outras condições<sup>52</sup>. 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)<sup>52,53</sup>. A principal falha desses testes diz respeito à natureza intrínseca dos extratos brutos usados, que, muitas vezes, são uma mistura imprevisível de substâncias alergênicas e não alergênicas, não existindo uma padronização entre empresas produtoras, o que leva, em alguns casos, um mesmo produtor possuir extratos diferentes da mesma fonte dependendo do lote em que este foi confeccionado<sup>54</sup>. Os testes de provocação oral (TPO) com o alimento pode ser útil dependendo da suspeita clínica e precisa ser realizado exclusivamente em ambiente hospitalar para maior segurança do indivíduo<sup>53</sup>.

Atualmente não há tratamento definitivo para alergia alimentar e o procedimento padrão inclui exclusão completa do alimento causador das reações da dieta, o que faz como que o indivíduo preste atenção especial à leitura dos rótulos de produtos alimentares, cuidados no consumo de alimentos em restaurantes e no preparo dos mesmos. Terapias sintomáticas que envolvem o uso de medicamentos como anti-histamínicos podem ser utilizadas, porém não alteram a patogênese da alergia. Nos casos graves de anafilaxia, é necessária a aplicação de adrenalina intramuscular acompanhada pelo monitoramento do indivíduo<sup>17,53,55</sup>.

Um tratamento disponível para alergia alimentar é a imunoterapia oral (OIT, do inglês – *Oral ImmunoTherapy*). Esta abordagem consiste em submeter o paciente a exposições repetidas com doses crescentes do alimento alergênico, desencadeando a indução à tolerância e, assim, podendo diminuir ou até mesmo eliminar os sintomas durante meses ou até mesmo por anos após o processo de dessensibilização ser concluído<sup>53,55</sup>. Essa estratégia tem se mostrado eficaz no tratamento de diferentes alergias alimentares comuns, incluindo as alergias às proteínas do leite de vaca e ovo de galinha<sup>53</sup>.

Atualmente, os estudos de novos alvos alergênicos para o desenvolvimento de produtos imunobiológicos têm ganhado atenção. A maioria dos tratamentos propostos

até o momento são baseados em anticorpos monoclonais contra IgE e citocinas (IL- 4 e IL- 5). O uso de omalizumab em alergia alimentar é recomendado para indivíduos com alergia grave que não obtiveram sucesso com OIT. Existem também estudos mostrando eficácia da abordagem combinada de omalizumab e OIT para o tratamento de alergias ao amendoim, ovo, leite e outros alimentos. Os estudos demonstram que este medicamento permite que a dose de manutenção alvo seja atingida mais rapidamente além de reduzir a taxa de gravidade das reações mediadas por IgE<sup>31,56</sup>.

### 1.5 ALERGIA À MANDIOCA (*MANIHOT ESCULENTA CRANTZ*)

A mandioca foi eleita pela ONU (Organização das Nações Unidas) como o alimento mais relevante do século XXI, tendo sido nomeada dessa maneira devido sua versatilidade já que é consumida por pessoas e animais, além de poder ser usada para a fabricação de vários derivados<sup>57</sup>.

A mandioca (*Manihot esculenta crantz*) é um arbusto da família das *Euphorbiaceae*. Suas raízes são tuberosas composta por 85% de amido e apenas 1 a 2% de proteína, possui alto valor energético. Contém fibras e alguns minerais como potássio, cálcio, fosforo, sódio e ferro e é cultivada em clima tropical e subtropical. É originária da América do Sul, mas pode ser encontrada também na Ásia e África, sendo incomum na Europa. É altamente tolerante a condições climáticas extremas (estiagem) e produtiva em solos pobres e terras marginais. Além disso, possui disponibilidade o ano todo devido a flexibilidade de plantio e colheita da safra. Essas características agrônômicas e nutricionais tornam a mandioca uma cultura confiável para a segurança alimentar<sup>58-61</sup>.

A mandioca é a terceira maior fonte de carboidratos alimentares e vitaminas como riboflavina, tiamina e ácido nicotínico, para cerca de 700 milhões de pessoas, especialmente aquelas vivendo em países em desenvolvimento, sendo o quarto alimento mais consumido, ficando atrás apenas de arroz, açúcar e milho; além disso, é uma importante matéria prima para a extração de amido<sup>59,60,62,63</sup>.

Esse vegetal serve de base para múltiplos produtos como farinha, que faz parte de refeições diárias da maioria dos brasileiros, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, além de servir para o preparo de ração para animais, álcool, doces, colas para papéis e tecidos, e produtos biodegradáveis. Além da sua importância alimentar, a



mandioca também tem se tornado importante fonte de emprego e renda para agricultores<sup>58,60,64</sup>.

A *Manihot esculenta* no Brasil, possui inúmeras denominações populares, dependendo da região do país, como por exemplo: mandioca, aipim ou macaxeira. Em outros países também é conhecida como: tapioca (Tailândia e Vietnã), cassava (Oeste da Índia) e Yucca (outros países da América do Sul).

A mandioca é dividida em dois grupos: as mansas ou doces, e as bravas ou amargas que se referem, respectivamente, às variedades que contêm menores ou maiores proporções de ácido cianídrico (HCN), uma substância extremamente tóxica produzida pela ação da enzima linamarase, através da hidrólise de glicosídeos cianogênicos (linamarina e lotaustralina) presentes no tecido da planta. A variedade doce tem como característica uma pele fina e branca e é encontrada com mais frequência no norte da América do Sul, enquanto a amarga possui uma casca rosada e mais espessa sendo esta mais comum nas regiões amazônicas e caribenhas, mas nem sempre a diferenciação entre as variedades amargas e doces é precisa. Geralmente seu consumo é cozido, frito ou assado. Os compostos cianogênicos precisam ser removidos pela descamação da pele, fervura, fatiamento, imersão, fermentação, torrefação, secagem ou moagem, que aparentemente inativam ou eliminam os componentes tóxicos<sup>63,65</sup>.

O primeiro relato de reação anafilática após ingestão de mandioca foi feito em 2003 em Portugal por Gaspar e colaboradores, em uma paciente de 51 anos de idade que apresentou anafilaxia após a ingestão de mandioca e que, por meio do teste de inibição para detecção de IgE específicos (RAST, do inglês – *RadioAllergoSorbent Test*), foi constatada reatividade cruzada entre látex e mandioca<sup>66</sup>. Em 2004, nosso grupo relatou o caso de duas mulheres sensibilizadas ao látex que apresentaram reação anafilática logo após consumir mandioca cozida<sup>67</sup>. Em 2007, na Espanha, Ibero e colaboradores, descrevem o caso de uma paciente de 27 anos que foi sensibilizada quando trabalhava em um restaurante cubano. Essa paciente desenvolveu broncoespasmo, prurido nasal e rinorréia hialina quando descascava mandioca crua<sup>68</sup>. Em 2012, Antolin-Amerigo e colaboradores descreveram outro caso em que uma mulher colombiana de 47 anos, residente na Espanha, apresentou dois episódios de anafilaxia após ingestão de mandioca cozida, porém negou sintomas quando em contato com o látex<sup>59</sup>.

Apesar desses relatos, existem apenas três alérgenos descritos para mandioca até o momento e somente um deles está bem caracterizado: o *Man e 5* alérgeno que equivale à proteína rica em ácido glutâmico (GARP, do inglês – *Glutamic acid rich protein*), que possui massa molecular de 30 kDa e tem como característica ser extremamente lábil à ação da pepsina e ao baixo pH do suco gástrico, sendo degradada em poucos segundos<sup>69</sup>. Por meio de ensaios de inibição, foi demonstrado que *Man e 5* inibe parcialmente a reatividade de IgE para *Hev b 5* (alérgeno descrito para látex), sugerindo assim que a reatividade IgE para a mandioca pode ocorrer em consequência da sensibilização prévia ao *Hev b 5*<sup>69</sup>. Além deste alérgeno, outras duas proteínas: FBA (*Fructose-biphosphate aldolase*), que tem massa molecular teórica de 39,9 kDa e GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), que apresenta massa molecular teórica de 36,8 kDa foram descritas como IgE-reativas também pelo nosso grupo, ambas em 2011<sup>70</sup>. Todos os relatos incluem casos de reatividade cruzada entre mandioca e látex com sensibilização primária pelo látex.

## 1.6 ALERGIA AO LÁTEX (*HEVEA BRASILIENSIS*)

O gênero *Hevea* também pertence à família *Euphorbiaceae* e é normalmente encontrado em grande parte na região Norte do Brasil e em países vizinhos como Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana. A classificação atual do gênero *Hevea* apresenta onze espécies, dentre as quais destaca-se a *Hevea brasiliensis* (seringueira), que tem maior capacidade produtiva e variabilidade genética. Esta espécie é a mais importante do gênero por ser uma das maiores fontes produtoras de borracha vegetal. Atualmente o Brasil é responsável por aproximadamente apenas 1% da produção mundial tendo que importar em torno de 75% do que consome<sup>71,72</sup>.

A borracha retirada da árvore da seringueira (Cis-1,4-poliisopreno) contém proteínas, lipídios e fosfolipídios que são responsáveis pela sua integridade estrutural, além de carboidratos e outros elementos orgânicos e inorgânicos. Existem mais de 200 proteínas na seiva do látex, mas apenas 15 delas são descritas como alergênicas. A *Hev b 6* é considerada o alérgeno mais importante possuindo uma concentração estimada no látex 1000 vezes mais alta quando comparada aos outros alérgenos. O segundo alérgeno mais importante do látex é o *Hev b 5*<sup>73</sup>, que como relatado anteriormente, reage cruzadamente com *Man e 5*.

Devido a sua grande elasticidade, o látex é encontrado em vários produtos do nosso dia-a-dia, como luvas, pneus, preservativos, balões, cateteres, goma de mascar, embalagens de alimentos, brinquedos, mamadeiras, entre muitos outros<sup>74</sup>. Dessa forma, a alergia ao látex afeta de 1 a 2% da população, sendo os profissionais da saúde os mais acometidos<sup>74</sup>.

Vandenplas e colaboradores (2017) mostraram que luvas com pó e não cirúrgicas são mais alergênicas comparadas àquelas que não possuem pó e cirúrgicas<sup>75</sup>. Uma vez que as proteínas do látex são solúveis em água, a absorção delas por mucosas é facilitada, especialmente durante a exposição a múltiplos procedimentos cirúrgicos, como acontece em pacientes com espinha bífida (prevalência de 20 a 65%). Normalmente, estes indivíduos são submetidos a diversas cirurgias durante a vida, como o parto cesárea, extrofia de bexiga, e correção de anormalidades urológicas, que são procedimentos que necessitam do uso de cateter<sup>74,76,77</sup>. Porém, a sensibilização ao látex pode ocorrer não só pelo contato com a pele e mucosas mas também por via inalatória devido a dispersão de amido no ar<sup>77</sup>.

A alergia ao látex pode, muitas vezes, ser confundida com dermatite de contato irritante ou alérgica. Quando irritante, o principal sintoma é o eritema na pele, e, no caso da dermatite alérgica, que ocorre devido uma reação de hipersensibilidade do tipo IV tardia (mediada por células de memória), além de eritema, ocorre prurido e urticária. Porém, estes sintomas não são definidos como sendo de alergia legítima ao látex, já que o uso de produtos livres de látex pode desencadear essas mesmas manifestações. Uma verdadeira alergia ao látex é uma reação de hipersensibilidade do tipo I imediata, que apresenta como sintomas, urticária e coceira na pele, mas também podem incluir angioedema, asma e até o desencadeamento de anafilaxia<sup>76</sup>.

## 1.7 REATIVIDADE CRUZADA

A reatividade cruzada é um fenômeno mediado pela imunidade de um anticorpo IgE que reconhece, se liga e induz uma resposta imune a moléculas alergênicas semelhantes (homólogas). Esse fenômeno possui grande importância por várias razões, como: sua base imunológica, sensibilização alérgica, pelo risco de resposta cruzada a novos alimentos e a identificação dos padrões de reatividade cruzada, que, por vezes, podem refletir no padrão das reações clínicas<sup>78</sup>.

Naturalmente, alimentos pertencentes a um mesmo grupo ou família podem reagir de forma cruzada e isto já foi amplamente estudado<sup>79,80</sup>, mas esse fenômeno também pode ocorrer entre alimentos e substâncias aparentemente não relacionadas<sup>81</sup>. Quanto mais próxima a similaridade entre dois alérgenos, maior a probabilidade de encontrar um anticorpo que apresente reatividade cruzada<sup>82</sup>. Porém, a reatividade cruzada imunológica não traduz, necessariamente, a existência de reatividade clínica. As sensibilizações assintomáticas aos alimentos são relativamente frequentes<sup>83,84</sup>.

As moléculas envolvidas nesse processo podem ser divididas em dois grupos: pan alérgenos e os determinantes de carboidratos de reação cruzada (CCDs, do inglês – *Cross-reactive Carbohydrate Determinants*). Os pan alérgenos são alérgenos que pertencem às famílias de proteínas presentes em diversas fontes diferentes, com sequências de aminoácidos bem preservadas e que se ligam à IgE e podem desencadear reações clínicas. Este tipo de reatividade cruzada geralmente é estudado sob a perspectiva estrutural do alérgeno, o que significa dizer que é consequência direta da similaridade entre proteínas homólogas, como sequências conservadas e dobramentos tridimensionais e/ou funções similares<sup>78</sup>.

Os CCDs são frações de carboidratos de glicoproteínas que induzem a produção de IgE. Muitos alérgenos de plantas e invertebrados são glicoproteínas contendo frações de carboidratos denominados N-glicanos, que interferem nas determinações de IgE específicas *in vitro*<sup>78</sup>. A sensibilização ao pólen de grama é a causa mais comum de sensibilização por CCDs em pacientes alérgicos aos alimentos e raramente causam reações clínicas, mas são uma causa importante de reatividade cruzada em ensaios *in vitro* de IgE específicos para alérgenos contendo CCD de pólen, alimentos vegetais, insetos e venenos<sup>78</sup>.

Em adultos, até 80% de todos os casos de alergia alimentar são precedidos por sensibilização (clínica ou subclínica) aos aeroalérgenos, sendo os sintomas clínicos observados nesses indivíduos causados devido a reações cruzadas entre alimentos ingeridos e alérgenos inalados<sup>85</sup>. Mesmo em crianças, sugere-se que a sensibilização cruzada possa ser encontrada em até 25% dos casos<sup>86</sup>.

Além da reatividade cruzada existe também a co-sensibilização que está subjacente à presença de IgE para epítomos que não são compartilhados entre fontes ou moléculas alergênicas. Nesse caso, as fontes alergênicas detectadas por meio de extratos são achados comuns (por exemplo, entre gramíneas e ácaros) mas não refletem o padrão

de moléculas alergênicas e/ou de anticorpos IgE específicos. Um indivíduo com sensibilização isolada a grama, por exemplo, pode apresentar IgE para várias moléculas alergênicas todas restritas à mesma família<sup>78</sup>.

## 1.8 SÍNDROME LÁTEX-FRUTA

Em 1994, houve a primeira descrição da existência de uma 'síndrome de látex-fruta', proposta com base na observação clínica de uma taxa consideravelmente alta de alergia a frutas em pacientes alérgicos ao látex, mesmo não existindo relação taxonômica entre as espécies vegetais relatadas e o látex<sup>87</sup>.

A síndrome látex-fruta ocorre devido a presença de reatividade cruzada entre antígenos presentes no látex e em alguns alimentos de origem vegetal, principalmente frutas tropicais (Tabela 1). Mais de 20 alimentos já foram relatados como causadores dessa reação e, geralmente, a sensibilização ao látex precede a sensibilização às frutas, mas o inverso também já foi relatado. Estima-se que 50% dos indivíduos alérgicos ao látex apresentem sintomas clínicos a pelo menos uma fruta. Em contraste, estima-se que apenas 10% de indivíduos com alergia primária à fruta desenvolvam sintomas de reatividade cruzada com látex<sup>22,88-91</sup>.

Tabela 1 – Principais alérgenos do látex que apresentam reatividade cruzada com alimentos

Alérgenos do látex	Reatividade cruzada com	Gravidade da reação
Hev b 1	Papaia e Figo	+++
Hev b 2	Banana e Tomate	+++
Hev b 5	Kiwi e Mandioca	+++
Hev b 6	Abacate, Castanha e Banana	+++
Hev b 6.03	Banana e Avelã	+++
Hev b 7	Batata e Tomate	NC
Hev b 8	Banana e Pólens	NC
Hev b 9	Tomate e Fungos	NC
Hev b 11	Banana, Abacate e Castanhas	NC
Hev b 12	Pêssego e outras frutas da família Rosaceae	++
Hev b 15	Trigo	NC

++ Moderada    +++ Grave    NC: Nada consta

\*69,89,92,93

A base molecular mais importante da síndrome látex-fruta é a homologia entre o domínio N-terminal da heveína (*Hev b 6.02*) do látex com a heveína das quitinases de classe I de plantas (70% de identidade), embora alguns determinantes da porção catalítica dessas quitinases também possam contribuir para a reatividade cruzada com látex (possivelmente quitinase classe I – *Hev b 11*). Outros alérgenos que possuem homólogos em alimentos vegetais e, portanto, são potenciais causas de reatividade cruzada são: *Hev b 1* (homólogo de papaína), *Hev b 2* (glucanases vegetais), *Hev b 4* (glicosidase vegetal), *Hev b 5* (proteína do ácido do kiwi), *Hev b 6* (proteína heveína de rabanete) *Hev b 6.03* (batata, tomate e proteínas e lectinas vegetais), *Hev b 7* (patatina de batata), *Hev b 8* (profilinas), *Hev b 9* (enolases), *Hev b 10* (Mn superóxido dismutases), *Hev b 12* (Proteína de Transferência de Lipídios de plantas – LTP, do inglês – *Lipid Transfer Protein*) e hevamina (classe III quitinases de plantas)<sup>94</sup>.

## 1.9 PROCESSAMENTO DOS ALIMENTOS

Um esforço significativo foi dedicado para entender as alterações bioquímicas dos alérgenos provocadas pelo processamento de alimentos, como tratamento térmico,

reação de Maillard, efeitos da matriz alimentar, bem como sua digestibilidade, levando-se em consideração que os alérgenos alimentares entram em contato com o sistema imune inicialmente pelo trato gastrointestinal<sup>15</sup>.

Estudos *in vitro* realizados em humanos e camundongos levantaram a hipótese de que o uso de medicamentos antiulcerosos (Omeprazol e Ranitidina) aumenta o pH gástrico, facilitando assim a sensibilização às proteínas consumidas por via oral<sup>95</sup>. Esses medicamentos pertencem a classe dos inibidores da bomba de prótons (IBPs) para distúrbios digestivos e estão entre os mais utilizados no Brasil e no mundo. Essa classe de medicamentos causam a síndrome do intestino permeável, que é quando o alimento é absorvido antes de ser completamente digerido. Isso pode resultar em alergias alimentares e esgotamento imunológico. Já foi discutido que, para *Man e 5*, a elevação do pH causada pelos IBPs resulta na manutenção intacta desse alérgeno, facilitando sua apresentação ao sistema imunológico<sup>96</sup>.

A modificação térmica das proteínas é importante na alergia alimentar, pois pode causar mudanças estruturais no alérgeno, como perda de interações secundárias e ou terciárias, formação de novos rearranjos de ligação dissulfeto ou outras modificações conformacionais devido à desnaturação após o processo de cozimento, tornando o mais ou menos alergênico<sup>97,98</sup>.

Já é sabido que a alergenicidade de uma determinada proteína não pode ser levada em consideração unicamente com base em sua estabilidade e/ou digestibilidade, pois está bem estabelecido que alérgenos alimentares intactos podem estimular uma resposta imune sensibilizante quando em contato com a pele, sugerindo que o microambiente tecidual onde o alérgeno e o sistema imunológico se encontram pode determinar se uma resposta Th2 será desencadeada<sup>15</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

Até o momento só existem três moléculas IgE-reativas relatados na literatura para mandioca, mas apenas uma delas está bem definida como alérgeno e possui reatividade cruzada com o *Hev b 5* do látex comprovada. Em nosso estudo, constatamos que algumas pessoas alérgicas à mandioca não apresentam alergia e nem sensibilização ao látex, indicando que não necessariamente um indivíduo alérgico a mandioca tenha sido sensibilizada primariamente por látex. Além disso, apresentam alergia a frutas, que podem ter alérgenos de reatividade cruzada com mandioca, o que merece uma investigação.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise proteômica do extrato de mandioca e identificar novos alérgenos, avaliando também possíveis reatividades cruzadas com látex, frutas e vegetais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a resposta IgE-mediada a proteínas presentes na mandioca e em frutas em que foram observadas reações clínicas;
- Avaliar em indivíduos alérgicos à mandioca as potenciais reatividades cruzadas com frutas diversas;
- Caracterizar possíveis novos alérgenos na mandioca;
- Produzir de forma recombinante proteína de mandioca IgE-reativa para teste da molécula individualizada;
- Testar a suscetibilidade da molécula produzida à digestão por pepsina.

## 4 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: 30801420.7.0000.0068) número do parecer: 4.1012.690 (Anexo A). Os indivíduos incluídos neste estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente no estudo “Imunoterapia Oral com Mandioca em Pacientes Alérgicos a Mandioca e ao Látex” (CAAE: 10420619.6.0000.0068) número do parecer: 3.281.927.

### 4.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MANDIOCA, FRUTAS E VEGETAIS POR FENOL/ACETATO

As frutas utilizadas neste estudo foram abacate (*Persea americana*), kiwi (*Actinidia deliciosa*), mamão (*Carica papaya*), mistura de Papaya e Formosa, pêssego (*Prunus pérsica*), banana (*Musa acuminata*), mistura de Prata e Nanica, morango (*Fragaria vesca/ Fragaria ananassa*), uva (*Vitis vinifera*), mistura de Itália, Brasil e Thompson, manga (*Mangifera indica*) mistura de Palmer e Tommy, abacaxi (*Ananas comosus*) e maracujá (*Passiflora edulis*), o arbusto avelós (*Euphorbia tirucalli*), o legume berinjela (*Solanum melongera*) e a raiz mandioca (*Manihot esculenta*). Todos foram comprados em supermercado, devidamente higienizadas e armazenadas em freezer -20°C até o momento da extração proteica.

A extração de proteínas foi feita de acordo com o procedimento descrito por Carpentier et al. (2005)<sup>99</sup> com algumas adaptações.

Todas as frutas e vegetais utilizados neste protocolo foram liofilizados previamente em liofilizador (Super Modulyo - Thermo Savant) por aproximadamente 30 horas antes da extração proteica para a retirada de água, exceto o avelós, pois já é um vegetal que não possui muita água então não se fez necessário esse processo.

Duas gramas de todas as frutas e vegetais foram maceradas com tampão de extração 1 (50 mM de Tris-HCl pH 8,5, acrescidos de 5 mM de EDTA, 100 mM de KCl, 1% de DTT e 30% de sacarose), acrescido de um coquetel contendo inibidores de protease EDTA free (P8340 Sigma-Aldrich-Missouri, EUA). Essa mistura foi agitada

em vortex 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, seguida de centrifugação a 3220 RCF por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e, para a precipitação das proteínas, foi utilizado acetato de amônio 100 mM diluído em metanol a -20 °C por 16 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 diluído 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 acrescidos de 2 M tiouréia, 4% CHAPS e 1% DTT).

A dosagem de proteínas totais dos extratos foi realizada pelo método de Bradford. Os extratos de proteínas totais das frutas, legume e a raiz foram conservados a -20 °C até o momento da sua utilização.

### 4.3 SHOTGUN

O extrato de mandioca crua extraído pelo protocolo de fenol/acetato foi liofilizado e enviado para digestão e sequenciamento peptídico para o Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista- UNESP campus Botucatu – Laboratório sob supervisão da Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos.

#### 4.3.1 Digestão de Proteínas em Solução

Foram utilizados 50 µg de extrato proteico que foi solubilizado em 60 µl de bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8. Em seguida, foi adicionado 25 µl do surfactante RapiGest à 0,2% (m/v) e incubado à 37°C por 1 hora. Nas etapas posteriores, as proteínas foram reduzidas na presença de 2.5 µl de Ditiotretol 100 mM (Calbiochem), incubadas à 37°C por 40 min e alquiladas com 2.5 µL de Iodoacetamida 375 mM por 30 minutos em temperatura ambiente livre de luz (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha). Em seguida, foi adicionado uma solução de tripsina (Promega, Mannheim, Alemanha) na razão 1:50 seguindo de incubação por 16 horas à 37°C. Por fim, o processo de

digestão enzimática é encerrado com a adição de 10 µl ácido Trifluoroacético 5% (v/v) (Roth, Mannheim, Alemanha). Para obtenção dos digestos trópticos, foi centrifugado a 16000 RCF por 30 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante coletado, liofilizado e armazenados a -20 °C até análise posterior. Os peptídeos foram desalinizados utilizando *Peptide Cleanup C18 Spin Tubes* (Agilent) segundo as instruções do fabricante previamente à espectrometria de massas.

#### 4.3.2 Sequenciamento Peptídico por Espectrometria de Massas

As frações peptídicas liofilizadas foram reconstituídas individualmente em ácido fórmico 0,1% (v/v) e submetidas a cromatografia líquida de nano-ultra-desempenho *Ultimate 3000 LC* (Dionex, Germering, Germany) utilizando ácido fórmico 0,1% [v/v] como tampão A e ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v] como tampão B. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30 µm x 5 mm (Código 164649, ThermoFisher Scientific) sob um gradiente isocrático de 4% de tampão B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min e eluídos por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3 µm, 120 Å, 105 mm (Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP), utilizando um gradiente linear de 4-55% B por 30 min, 55% a 90% B por 1 minuto, mantido a 90% B por 5 minutos e reequilibrado a 4% B por 20 minutos a um fluxo de 200 nL/min. A eluição dos peptídios foi acoplada diretamente à ionização por um espectrômetro de massas *Q-Exactive* (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). A ionização foi obtida utilizando uma fonte *Nanospray ion source* (PICOCHIP) com modo de operação positiva pelo método DDA e os espectros MS adquiridos de m/z 200 a m/z 2000, numa resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão de 29 a 35% com resolução de 17.500 e 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10 s. Os dados foram adquiridos por meio do *software* Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

#### 4.3.3 Análise de Dados

Os dados brutos no formato RAW. foram submetidos ao *software* PatternLab (versão 4.0.0.84<sup>100</sup>) para a obtenção da identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados UNIPROT (taxonomia:

*Manihot*); enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS 40 ppm e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (*Falso Discovery*) máxima considerada foi de  $\leq 1\%$ . Para identificação de proteínas alergênicas foi utilizado o banco de dados Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) (taxonomia: *Manihot esculenta* 6.1), *Target type: Proteome, Program: BLASTP - protein query to protein db.*

#### 4.4 RECRUTAMENTO DOS INDIVÍDUOS

Todos os indivíduos selecionados para este estudo são participantes do protocolo de pesquisa intitulado: “Imunoterapia Oral com Mandioca em Pacientes Alérgicos a Mandioca e ao Látex” (CAAE: 10420619.6.0000.0068), conduzido pela Roberta Almeida Castro Araujo, médica no ambulatório de Alergia e Imunologia do HCFMUSP, durante seu mestrado, realizado sob supervisão do Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato Castro. A partir deste estudo prévio, selecionamos 10 indivíduos do sexo feminino, com faixa etária mediana de 53,5 anos com alergia confirmada a mandioca, que apresentavam história prévia compatível com alergia e teste *prick to prick* com a mandioca crua (Tabela 2). Alguns também possuíam alergia para algumas frutas e látex que foram confirmadas por teste *prick to prick* posteriormente.

O teste de *prick to prick* é realizado a partir do alimento a ser testado, aplica-se o puntor no alimento e em seguida na pele do antebraço do indivíduo. Testes com diâmetro de papula  $< 3$  mm foram considerados negativos.

Tabela 2 – Sintomas clínicos e teste *prick to prick* para mandica dos indivíduos selecionados para o estudo

Sintomas clínicos														
Indivíduos	Profissional da saúde?	Primeiros sintomas com		<i>Prick to prick</i> mandioca crua	Sintomas Respiratórios				Sintomas Cutâneos		Sintomas Gastrointestinais			Episódios de Anafilaxia
		Látex	Mandioca/ frutas		Dispneia	Tosse	Espirros	Coriza	Urticária	Angioedema	Náusea	Dor abdominal	Diarreia	
1	Não	-	Sim	9x6 mm	X	X	X	X	-	X	X	-	-	3
2	Sim	-	Sim	10x9 mm	X	-	-	-	X	-	-	-	-	2
3	Sim	Sim	-	6x7 mm	X	-	X	X	-	X	-	-	-	1
4	Sim	Sim	-	5x4 mm	X	-	X	X	X	X	-	-	-	1
5	Sim	-	Sim	4x3 mm	-	-	-	-	-	X	-	-	-	0
6	Sim	-	Sim	16x9 mm	-	-	-	-	X	X	-	-	-	0
7	Não	-	Sim	6x6 mm	X	X	X	X	X	X	X	-	X	7
8	Sim	Sim	-	6x5 mm	X	-	-	-	x	X	-	-	-	4
9	Não	SI	-	7x10 mm	X	X	X	X	X	X	-	-	-	1
10	Sim	Sim	-	12x6 mm	X	-	-	-	-	X	X	X	-	2

*Prick to prick*: Positivo  $\geq$  3x3mm SI: Sem informação

#### 4.5 PESQUISA DE IGE ESPECÍFICA *IN VITRO* (IMMUNOCAP)

Foram realizados testes de ImmunoCAP para látex (K82) e seus alérgenos específicos que possuem teste disponível K215 - *Hev b 1*: fator de alongamento da borracha; K217 - *Hev b 3*: proteína da partícula da borracha; K218 - *Hev b 5*: proteína ácida; K220 - *Hev b 6.02*: precursor de heveína; K221 - *Hev b 8*: profilina e K2214 - *Hev b 11*: quitinase classe I. O ensaio é realizado de forma automatizada no equipamento (Phadia 100), dedicado à rotina clínica e alocado no Laboratório de Investigação Médica 60 – LIM-60.

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  $\beta$ -galactosidase). 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 medidos em unidades de resposta (RU, do inglês – Respost Unit) são comparados com a curva de calibração armazenada no equipamento. Resultados  $\geq 0,35$  kUA/L foram considerados positivos.

#### 4.6 ELETROFORESE 1D E 2D

Para os ensaios de eletroforese 1D foram utilizados os extratos das frutas, vegetais e mandioca produzidos em nosso laboratório. A separação inicial das proteínas do extrato bruto foi realizada por eletroforese 1D e 2D em gel de poliacrilamida 12%.

As amostras foram previamente aquecidas a 95°C na presença de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) e de um reagente *thiol* (2-mercaptoetanol), para desnaturação e quebra das pontes dissulfeto. A corrente aplicada foi de 35 mA/gel até o fim da corrida.

Para eletroforese 1D cerca de 20 µg de proteínas do extrato total foi aplicado em cada poço do gel e 3 µg de proteína recombinante frutose bifosfato aldolase (FBA, do inglês – *Fructose-Biphosphate Aldolase*) e para eletroforese 2D foi aplicado cerca de 250 µg no gel e 100 µg para *Western Blotting* (WB) de extrato total de mandioca.

Primeira dimensão - Focalização isoeétrica (IEF, do inglês – *IsoElectric Focusing*): 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 (*Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*): Após a primeira dimensão as fitas de IPG foram incubadas em tampão de equilíbrio 1 (75 mM Tris-HCl, pH 8.8 acrescidos de uréia 6 M, 30% de glicerol, 10 mg/mL DTT, 2% de 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, substituindo-se DTT por 25 mg/mL de iodoacetamida) para alquilação destas pontes. As fitas foram então transferidas para os géis de 10% de poliacrilamida contendo SDS que foram corados com *Commassie Blue* Coloidal. As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

#### 4.7 WESTERN BLOTTING

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas 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 e colaboradores<sup>101</sup> em cuba de eletrotransferência *miniVE Vertical Electrophoresis System* (Amersham Pharmacia Biotech)

Nos ensaios de *Western Blotting* para detecção de IgE específicas às proteínas de mandioca, frutas, vegetais e proteína recombinante foram utilizados soros de indivíduos com alergia a mandioca com diagnóstico confirmado no ambulatório de Alergia e



Imunologia do HCFMUSP. O anticorpo secundário utilizado foi Anti-IgE humano produzido em camundongos ( $\epsilon$ -específica) e conjugado à *Horseradish Peroxidase* (HRP) (Invitrogen-Califórnia, EUA).

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-T 1x (*Tris Buffered Saline*), *Tween* 20 a 0,1% (v/v) e leite em pó desnatado (Biorad - Blotting-Grade Blocker) na concentração de 5% (m/v) quando testado extrato total de mandioca, frutas e vegetais e na concentração de 10% (m/v) quando testado para FBA recombinante 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 aproximadamente 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 quando testado em extrato total de mandioca, frutas e vegetais e na proporção de 1:7500 quando testado para FBA recombinante por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 3 vezes com TBS 1x e *Tween* 20 a 0,1% (v/v) durante 10 minutos em temperatura ambiente. Para detecção por quimioluminescência foi utilizado o *Kit Enhanced Chemi Luminescence* (ECL) (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suécia), segundo recomendações do fabricante. Foi aplicada quantidade suficiente para cobrir a membrana e incubada protegida da luz por 1 minuto antes da leitura. As membranas foram reveladas utilizando o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

#### 4.8 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para as análises de espectrometria de massa, sete *spots* IgE-reativos do gel 2D foram digeridos com tripsina (Promega - Madison, WI, EUA) segundo protocolo de Shevchenko e colaboradores<sup>102</sup>. Os digestos trípticos foram solubilizados em solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) (solução A) e submetidos a HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Germering, Alemanha) acoplado a um espectrômetro de massa Q Exactive Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). Os peptídeos foram carregados em uma Coluna *Trap* com *Nano Viper Fitting* (P/N 164.649, C18, 5 mm × 30  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) e eluídos a uma taxa de fluxo de 300 nL/min

usando um gradiente isocrático de 4% de solução B (100% ACN contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico) durante 3 minutos. Posteriormente, os peptídeos foram carregados em uma coluna C18 PicoChip (Reprosil-Pur®, C18-AQ, 3 µm, 120 Å, 105 mm, New Objective, Woburn, MA, EUA) usando um gradiente de concentração segmentado de 4 a 55% B para 30 minutos, 55-90% B por 1 minuto, 90% B durante 5 minutos e depois retornando a 4% B durante 20 minutos a uma taxa de fluxo de 300 nL/min. A polaridade do íon foi definida para o modo de ionização positiva usando o modo de aquisição dependente de dados (DDA). Os espectros de massa foram adquiridos com uma faixa de varredura de m/z 200-2000, resolução de 70.000 e tempo de injeção de 100 ms. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 e 35% com resolução de 17.500, tempo de injeção de 50 ms, janela de isolamento m/z 4,0 e exclusão dinâmica de 10 s. Os dados espectrométricos foram adquiridos usando o *software* Thermo Xcalibur™ (versão 4.0.27.19, Thermo Fisher Scientific Bremen, Alemanha).

Os dados brutos foram submetidos ao *software* PatternLab for Proteomics versão 4.0.0.84 Carvalho e colaboradores<sup>100</sup> e pesquisados no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o *Taxonomy Manihot* e a plataforma AllerCatPro version 2.0 (<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>) para análise do potencial de alergenicidade das proteínas.

## 4.9 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DE FRUTOSE BIFOSFATO ALDOLASE, GLICERALDEÍDO -3- FOSFATO DESIDROGENASE E ALFA 1- 4 GLUCANO FOSFORILASE

### 4.9.1 Clonagem das Sequências de Interesse

Os genes de interesse FBA (1164 pb), GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) (1101 pb) e alfa 1-4 glucano fosforilase (AGF) (2937 pb) foram desenhados e otimizados com códons preferencialmente utilizados por mamíferos e uma sequência de Kozak foi incluída na terminação 5', a fim de favorecer a expressão proteica, além de um peptídeo sinal IgE (endereço proteico para exocitose) e uma cauda de histidina, para posterior purificação em coluna de níquel. A sequência gênica foi obtida a partir da transcrição da sequência proteica disponível no banco de dados UNIPROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). O gene desenhado foi sintetizado pela GenOne

Biotech© e clonado no vetor de expressão pcDNA3.1 (Thermo Fisher), utilizando-se as enzimas de restrição XbaI e ApaI (Invitrogen).

#### 4.9.2 Transformação de Bactérias TOP10 *E. coli* por Choque Térmico

Para a transformação, aproximadamente 200 ng do DNA plasmidial foram adicionados em tubos de microcentrífuga contendo alíquotas de 100 µL de bactérias TOP10 *E. coli* competentes (Thermo Fisher). Após incubação em gelo por 15 minutos, os tubos foram colocados a 42 °C por 45 segundos e recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 1 mL de meio LB líquido (Invitrogen) e os tubos foram incubados a 37 °C por 1 hora, sob agitação. O volume total da mistura foi semeado em placas de LB sólido (Invitrogen) contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma) e estas foram incubadas a 37 °C durante 14 a 16 horas para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

#### 4.9.3 Extração e Purificação do DNA Plasmidial

A purificação do plasmídeo foi feita utilizando o kit *PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep* (Invitrogen). Inicialmente foi realizada a cultura de bactérias TOP10 *E. coli* transformadas em 200 mL de meio LB líquido (Invitrogen) contendo ampicilina (100µg/mL). A cultura de bactérias transformadas com o plasmídeo foi incubada a 37 °C sob agitação (200 rpm) durante 16 horas em agitador horizontal tipo orbital (Thermo Forma - modelo 435). Após esse período, o material foi centrifugado a 4.000 RCF por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de bactérias foi ressuscitado em 40 mL de *Ressuspension Buffer* (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM e RNase). Em seguida, adicionou-se 40 mL de *Lysis Buffer* (NaOH 0,2 M e SDS 1%) para a completa lise da parede bacteriana. Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, acrescentou-se 40 mL de *Preceparation Buffer* (acetato de potássio 3,1 M pH 5.5) para neutralização da reação. A solução com as bactérias lisadas foi transferida para uma coluna com filtro previamente equilibrada com *Equilibration Buffer* (acetato de sódio 0,1 M pH 5.0, NaCl 0,6 M e Triton® X-100 0,15%). A solução foi lavada duas vezes com *Wash Buffer* (acetato de sódio 0,1 M pH 5.0 e NaCl 825 mM). Em seguida, 10 mL de *Elution Buffer* (Tris-HCl 100 mM pH 8.5 e NaCl 1,25 M) foram aplicados à coluna e o DNA plasmidial foi coletado em tubo

estéril. O DNA eluído foi precipitado com 7 mL de isopropanol por 1 hora a -20 °C. Em seguida foi centrifugado a 15.000 RCF por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente o DNA foi lavado com 5 mL de etanol 70% (em água estéril, livre de endotoxinas) e centrifugado a 15.000 RCF por 5 minutos a 4 °C. Após secagem do *pellet* ao ar livre, o mesmo foi ressuscitado em 300 µl de água estéril livre de endotoxinas e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

#### 4.9.4 Quantificação e Avaliação dos Plasmídeos Purificados

Após purificação foi realizada a quantificação e a avaliação dos plasmídeos purificados. A quantificação dos plasmídeos foi realizada por método espectrofotométrico (NanoDrop, Thermo Fisher). A avaliação da integridade do plasmídeo foi realizada utilizando as enzimas de restrição XbaI e ApaI. Aproximadamente 500 ng do plasmídeo foi incubado à 37°C por 1 hora com as enzimas de restrição e tampão *React II 1x*. Em seguida, o produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. Para isso, as amostras foram ressuscitadas em tampão de eletroforese 1x (0,25% azul de bromofenol e 40% de sacarose diluídos em água) e o material foi submetido à eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM pH 8) utilizando 120V por aproximadamente 1 hora. O *Ready-load 1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen) foi utilizado como marcador de massa molecular. O gel foi corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio (Invitrogen) e a visualização das bandas foi realizada em luz ultravioleta no aparelho *MultiImage Light Cabinet* (Alpha Innotech).

#### 4.10 EXPRESSÃO DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES DA MANDIOCA EM CÉLULAS EXPI293F

As células Expi293F (ThermoFisher) foram mantidas em meio de expressão à temperatura de 37 °C, sob agitação constante de 125 rpm em *shaker* com órbita de 19 mm (ThermoFisher) em atmosfera de 8% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a densidade necessária para transfecção. O protocolo seguido para cultivo, manutenção e expressão de proteínas recombinantes é o recomendado pelo fabricante<sup>103,104</sup>.

No momento da transfecção as células Expi293F, ajustadas para a densidade de 3x10<sup>6</sup> células/ml, foram suspensas em um novo Erlenmeyer contendo 100 mL de meio

de expressão (Expression Medium Expi293 - referência A14351-01). Para o preparo de 100 ml de meio utilizamos  $300 \times 10^6$  células.

Depois do preparo das células na densidade recomendada, foi preparado o mix de transfecção adicionando 6 ml de OptMen em dois tubos de fundo cônico de 50 ml. No primeiro tubo foi acrescentado 320  $\mu$ l de *Expi Fectamine Transfection Reagent* (ThermoFisher) e no segundo tubo foi adicionado 100  $\mu$ g do DNA plasmidial da proteína de interesse. Ambos os tubos foram homogeneizados delicadamente e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. Ao final do tempo, o conteúdo dos tubos foi misturado e incubado a temperatura ambiente por mais 10 minutos. Em seguida, o mix de transfecção foi gotejado cuidadosamente sobre as células realizando agitação manual do Erlenmeyer. Após 20 horas da transfecção, adicionamos os reagentes, *Transfection Enhancer 1* (600  $\mu$ l) e *Transfection Enhancer 2* (6 mL). O tempo para expressão das proteínas de interesse foi de cinco dias em cultura. Após esse período, o meio de cultura contendo as proteínas recombinantes de interesse foi coletado, após centrifugado a 3200 RCF por trinta minutos para remoção das células. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45  $\mu$ m e submetido a purificação de proteínas em coluna de cromatografia por afinidade a metais (IMAC).

#### 4.11 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EM COLUNA DE CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE A METAIS

Devido a presença de cauda de histidina na proteína a purificação do sobrenadante foi realizada por IMAC. O sobrenadante contendo as proteínas foi diluído 1:1 em PBS 1x (Tampão Fosfato Salino) pH 7,4 onde foi adicionado 4 mL de resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (Cytivia) e 1 mL de imidazol 500 mM para cada 100 mL de sobrenadante diluído. Essa mistura foi deixada sob agitação leve por 1 hora e 30 minutos na temperatura de 4°C. Essa mistura foi adicionada em uma coluna de plástico de 20 mL para cromatografia onde ocorreu o empacotamento da resina e após foi lavada com 200 mL de imidazol 5 mM em PBS 1x pH 7,4. Após a lavagem foi adicionado 1 mL de imidazol em diferentes concentrações (50 mM, 250 mM e 500 mM) e as frações foram coletadas, isso foi realizado para favorecer o desligamento da cauda de histina da proteína na resina. Todas as frações coletadas foram dosadas em *Spectrophotometer ND 1000 Nanodrop* (Uniscience) para confirmação de que a proteína estava eluída nas frações coletadas.

Uma vez que a proteína purificada estava em tampão de imidazol foi necessário fazer a troca por outro tampão. Foi realizada uma dialise com quatro litros de PBS 1x pH 7,4 por 2 horas a 4 °C. A concentração da proteína após a dialise foi novamente medida no *Spectrophotometer ND 1000 Nanodrop* (Uniscience).

#### 4.12 SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO GÁSTRICA

Foi realizada uma simulação *in vitro* da degradação da proteína FBA na presença da enzima Pepsina (Sigma - P6887), a fim de avaliar a estabilidade da proteína à digestão gástrica. A mesma foi diluída em HCL 0.1M pH 2 para a concentração de 3 µg/ µL e armazenada em -20 °C. até o momento do uso. Em um microtubo, foi misturado: 60 µg da proteína FBA, 4% de pepsina (a solução estoque foi diluída 5 vezes) e 114 µL HCL 0.45M ph 2. Essa mistura foi incubada a 37°C sob leve agitação em ThermoMixer C (Eppendorf) a reação foi parada em diferentes tempos: 10 minutos, 30 minutos e 1 hora. A reação foi parada com 2 µL de solução NaOH 1 M e congeladas a -20°C até o momento da aplicação em gel SDS-PAGE 12% para visualização.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE PROTEÔMICA POR SHOTGUN DO EXTRATO PROTÉICO DE MANDIOCA

Foi realizada uma extração proteica de mandioca, o mesmo foi liofilizado e enviado para digestão e sequenciamento peptídico no CEVAP - UNESP - Botucatu, para uma análise das proteínas totais presentes neste extrato. As análises de *shotgun* resultaram na identificação de 1008 hits protéicos e, após confronto com o banco de dados da mandioca, as análises por parcimônia geraram identificação de 474 proteínas. Essas proteínas foram analisadas no banco de dados AllerCatPro 2.0, banco de predição de alérgenos, e, após a análise, foram selecionadas 97 proteínas que apresentaram semelhanças com alérgenos conhecidos (Tabela 3). Em destaque está o grau de evidência de alergenicidade. Sua classificação é baseada no peso da evidência proveniente dos diferentes níveis de semelhança com alérgenos conhecidos, quando “forte” significa que há semelhança clara com alérgenos conhecidos e quando “fraca” indica que existe alguma semelhança com alérgenos conhecidos mas com alguma divergência entre as sequências das proteínas e características estruturais necessárias para desencadear uma forte reatividade cruzada. 46 proteínas foram identificadas com alto grau de evidência de alergenicidade.

Entre todas as categorias de alérgenos a que possui mais organismos é a de alimentos com 26 organismos diferentes, que contemplam 40% de todos os alérgenos identificados, deste total mais da metade possui forte grau de evidência de alergenicidade. Outra categoria com mais alérgenos é a de fungos com 15 espécies diferentes que representam 26% dos alérgenos, plantas possuem 7 espécies com 14% dos alérgenos, insetos também possuem 7 espécies diferentes com 7% dos alérgenos, ácaros com 6 espécies e 11% e a categoria animal só contempla uma espécie que representa 1% do total.

**Tabela 3 – Resultados das análises do banco de alérgenos AllerCatPro 2.0 agrupados por organismo**

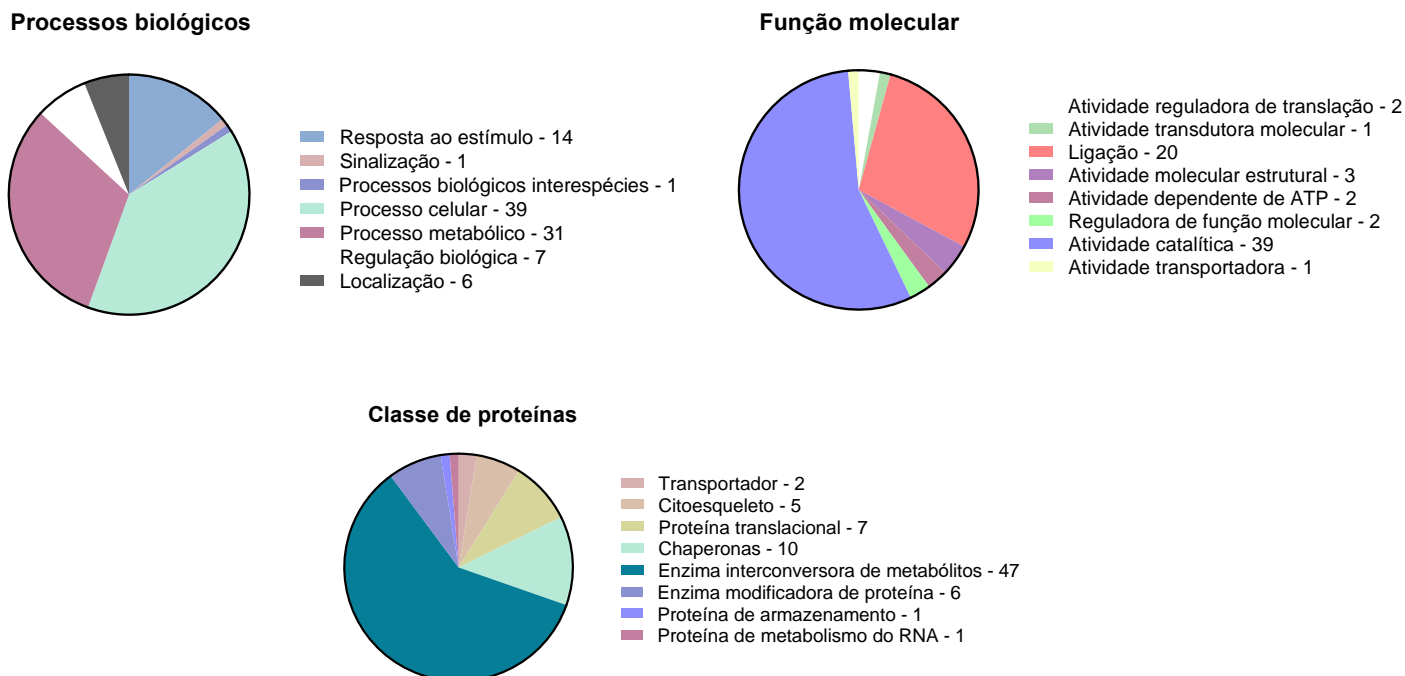
ID UniProt	Proteína	Alérgeno descrito em outra fonte	Organismo	Categoria (nome comum)	ID UniProt/NCBI	Grau de evidência de alergenidade
A0A251J147	Aspartate aminotransferase	AATC_BOVIN Aspartate aminotransferase,	-		P33097	Forte
A0A2C9V8Y6	Cystatin domain-containing protein	Act c 4	<i>Actinidia chinensis</i>	Alimento (kiwi)	P86472	Forte
A0A2C9W2S4	Pectinesterase	Act d 7	<i>Actinidia deliciosa</i>	Alimento (kiwi)	P85076	Fraca
A0A251IV43	Uncharacterized protein	Act d 1	<i>Actinidia deliciosa</i>	Alimento (kiwi)	A5HIJ6	Fraca
A0A2C9VH21	Uncharacterized protein	Aed a 8	<i>Aedes aegypti</i>	Inseto	Q1HR69	Forte
A0A2C9VGT7	TCTP domain-containing protein	Alt a TCTP	<i>Alternaria alternata</i>	Fungo	DOMQ50	Fraca
A0A2C9UCL2	Uncharacterized protein	Alt a 12	<i>Alternaria alternata</i>	Fungo	P49148	Forte
A0A2C9U2B3	Aldedh domain-containing protein	Alt a 10	<i>Alternaria alternata</i>	Fungo	P42041	Fraca
A0A2C9UF41	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	Alt a 7	<i>Alternaria alternata</i>	Fungo	P42058	Fraca
A0A251JD6	Abhydrolase_3 domain-containing protein	Api m 8	<i>Apis mellifera</i>	Inseto	B2D0J5	Fraca
A0A2C9V576	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Ara h 18	<i>Arachis hypogaea</i>	Alimento (amendoim)	A0A444X596	Forte
A0A2C9URR7	Peroxidase	Arm r HRP	<i>Armoracia rusticana</i>	Alimento (raiz – forte)	P00433	Fraca
A0A251LLC8	Uncharacterized protein	Art v 5	<i>Artemisia vulgaris</i>	Planta	Q2KM81	Fraca
A0A2C9WEI4	Protein disulfide-isomerase	Alt a 4 homolog	<i>Arthroderma benhamiae</i>	Fungo	D4B2L8	Fraca
A0A2C9V316	Beta-hexosaminidase	Pen c 20 homolog	<i>Arthroderma benhamiae</i>	Fungo	D4AYT4	Fraca
A0A2C9VU41	Uncharacterized protein	Alt a 4 homolog	<i>Arthroderma benhamiae</i>	Fungo	D4B2L8	Fraca
A0A2C9U930	Formate dehydrogenase, mitochondrial	Asp f FDH	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo	BOYCV9	Fraca
A0A2C9UCS2	Malate dehydrogenase	Asp f MDH	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo	BOYB25	Forte
A0A251IQB4	Peptidase_S9 domain-containing protein	Asp f DPPV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo	BOXRV0	Fraca
A0A2C9UMD1	Thioredoxin domain-containing protein	Asp f 28	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo	Q1RQJ1	Fraca
A0A251JZ42	Uncharacterized protein	Asp f Glucosidase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo	BOXPE1	Fraca
A0A2C9W8Z9	Beta-galactosidase OS=Manihot esculenta	Asp o Lactase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungo	Q2U6P1	Forte
A0A251IYP4	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	Bea b Ald	<i>Beauveria bassiana</i>	Fungo	Q0PV91	Fraca
A0A2C9VDN3	GST N-terminal domain-containing protein	Bet v 8	<i>Betula pendula</i>	Planta	A0A096XCA4	Forte
A0A251KGD8	Uncharacterized protein	Glutathione S-transferase	<i>Blattella germanica</i>	Inseto	A9QUN5	Fraca
A0A2C9VLR1	Uncharacterized protein	Bla g RACK1	<i>Blattella germanica</i>	Inseto	Q09KA1	Fraca
A0A2C9UDV2	Uncharacterized protein	Blo t 2	<i>Blomia tropicalis</i>	Ácaro	Q1M0Y2	Fraca
A0A2C9W854	Thioredoxin-dependent peroxiredoxin	PeroxidaseA	<i>Bombyx mori</i>	Inseto	Q6T3A7	Fraca
A0A2C9V672	Uncharacterized protein	Bos d OSCP	<i>Bos taurus</i>	Animal	P13621	Forte
A0A2C9UNE1	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	Cand a 1	<i>Candida albicans</i>	Fungo	P43067	Fraca
Q52QX1	L-ascorbate peroxidase	Cap a 30kD	<i>Capsicum annuum</i>	Alimento (pimenta)	Q42661	Forte
A0A2C9V3S4	SHSP domain-containing protein	Cas s 9	<i>Castanea sativa</i>	Alimento (castanha portuguesa)	Q9ZS24	Forte
A0A2C9W6F0	Malate dehydrogenase	Citr I MDH	<i>Citrullus lanatus</i>	Alimento (melancia)	P17783	Forte
A0A2C9UPS6	NTF2 domain-containing protein	Cla h NTF2	<i>Cladosporium herbarum</i>	Fungo	Q8NJ52	Fraca
A0A251LKW3	PKS_ER domain-containing protein	Cur I ADH	<i>Cochliobolus lunatus</i>	Fungo	A1YDT6	Fraca
A0A2C9UD79	Peptidase A1 domain-containing protein	Cry j AP	<i>Cryptomeria japonica</i>	Planta (cedro japonês)	D4QB70	Fraca
A0A2C9VSM6	Uncharacterized protein	Cuc p AscO	<i>Cucurbita pepo</i>	Alimento (abobrinha)	P37064	Fraca
A0A2C9VL08	60S acidic ribosomal protein P0	Cul n 1	<i>Culicoides nubeculosus</i>	Inseto	Q9BMP6	Forte
A0A2C9VRM1	Tr-type G domain-containing protein	Der f EF	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Ácaro	L7UW58	Forte
A0A2C9UP07	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Der f 29	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Ácaro	A1KXG2	Fraca
A0A2C9VZ37	ADF-H domain-containing protein	Der f 31	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Ácaro	A0A088SAY1	Forte
A0A2C9UDZ3	Uncharacterized protein	Der f 34	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Ácaro	A0A111DL12	Forte
A0A2C9VIK5	Inorganic diphosphatase	Der p 32	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Ácaro	A0A481MR39	Forte
A0A2C9UGV6	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	For t 2	<i>Forcipomyia taiwana</i>	Inseto	B2ZPG7	Fraca
A0A2C9VV21	Nucleoside diphosphate kinase	Gad m NDKB	<i>Gadus morhua</i>	Alimento (bacalhau)	G8DZS2	Fraca
A0A2C9WLB4	AAI domain-containing protein	Gly m 1	<i>Glycine max</i>	Alimento (soja)	Q9S7Z9	Fraca
A0A2C9ULK7	Aldedh domain-containing protein	Har a 2	<i>Harmonia axyridis</i>	Inseto	-	Fraca
A0A2C9V8B3	Phosphopyruvate hydratase	Hev b 9	<i>Hevea brasiliensis</i>	Planta (látex)	Q9LEI9	Forte
A0A2C9WGI0	HATPase_c domain-containing protein	Hev b HSP80	<i>Hevea brasiliensis</i>	Planta (látex)	Q71EE1	Forte
A0A2C9V0Y6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Hev b CyP	<i>Hevea brasiliensis</i>	Planta (látex)	F8RW92	Forte
A0A2C9VLE6	Superoxide dismutase	Hev b 10	<i>Hevea brasiliensis</i>	Planta (látex)	P35017	Forte
A0A2C9USJ1	Uncharacterized protein	Hev b 3	<i>Hevea brasiliensis</i>	Planta (látex)	F8SKC3	Forte
A0A199U962	Uncharacterized protein	Hev b 4	<i>Hevea brasiliensis</i>	Planta (látex)	Q6T4P0	Forte
A0A2C9U850	Thioredoxin domain-containing protein	Hev b Trx	<i>Hevea brasiliensis</i>	Planta (látex)	Q9XF70	Forte
A0A2C9UL58	Tubulin beta chain	Lep d 33	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	Ácaro	Q8WQ47	Fraca
A0A2C9W8P3	Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin	Mala f 2	<i>Malassezia furfur</i>	Fungo	P56577	Fraca
A0A2C9W3A3	Uncharacterized protein	Mala s 10	<i>Malassezia sympodialis</i>	Fungo	M5E549	Fraca
A0A2C9VQ42	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Man i 1	<i>Mangifera indica</i>	Alimento (manga)	ANQ43386	Forte
A0A2C9UU41	Uncharacterized protein	Man e 5	<i>Manihot esculenta</i>	Alimento (mandioca)	Q6XQ13	Forte



ID UniProt	Proteína	Alérgeno descrito em outra fonte	Organismo	Categoria (nome comum)	ID UniProt/NCBI	Grau de evidência de alergenidade
A0A2C9VGK1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	Mor a 2	<i>Morus alba</i>	Alimento (amora)	QOS47419	Forte
Q9SW99	Catalase OS=Manihot esculenta	Catalase	<i>Musa acuminata</i>	Alimento (banana)	A8D5T8	Forte
A0A2C9WFG6	Aconitate hydratase	Asp f IPMI	<i>Neosartorya fumigata</i>	Fungo	B0XSF6	Fraca
A0A2C9UAF1	KH type-2 domain-containing protein	Asp f RPS3	<i>Neosartorya fumigata</i>	Fungo	B0XP55	Fraca
A0A2C9UM98	HP domain-containing protein	Nic t Villin	<i>Nicotiana tabacum</i>	Planta	Q5K4L5	Fraca
A0A2C9UM98	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Ole e 9	<i>Olea europaea</i>	Alimento (azeitona)	Q94G86	Fraca
A0A2C9U7K8	Lactoylglutathione lyase	Ory s Glyoxalase I	<i>Oryza sativa</i>	Alimento (arroz)	Q948T6	Forte
A0A251LWJ3	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	Ory s GBSS_I	<i>Oryza sativa</i>	Alimento (arroz)	Q0DEV5	Forte
A0A2C9VH59	Fructose-bisphosphate aldolase	Unknown	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Alimento (peixe panga)	UPI000F00FADE	Forte
A0A2C9U1P6	Glucose-6-phosphate isomerase	Unknown	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Alimento (peixe panga)	UPI000EFFEE94	Fraca
A0A2C9W550	Pyruvate kinase	Unknown	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Alimento (peixe panga)	UPI000F00A6C1	Forte
A0A2C9VC28	Transaldolase	Pen ch 35	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Fungo	G8Z408	Fraca
A0A2C9VQ51	EF1_GNE domain-containing protein	Pen c 24	<i>Penicillium citrinum</i>	Fungo	Q69BZ7	Fraca
A0A2C9VPQ4	ATP synthase subunit beta	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	<i>Penicillium glabrum</i>	Fungo	P85446	Forte
A0A2C9W1M6	Chitin-binding type-1 domain-containing protein	Pers a 1	<i>Persea americana</i>	Alimento (abacate)	P93680	Forte
A0A2C9VQD4	Superoxide dismutase	Phl p Fe/Mn-SOD	<i>Phleum pratense</i>	Planta	K6ZYLO	Fraca
A0A2C9VN82	Ferritin OS=Manihot esculenta	Pro c 21kD	<i>Procambarus clarkii</i>	Alimento (lagostim)	F5A6F3	Fraca
A0A2C9V1S4	Uncharacterized protein	Pru du 5	<i>Prunus dulcis</i>	Alimento (amêndoa)	Q8H2B9	Forte
A0A199UA05	ML domain-containing protein	Pso o 2	<i>Psoroptes ovis</i>	Ácaro	Q965E2	Fraca
A0A2C9W0V4	NmrA domain-containing protein	Pyr c 5	<i>Pyrus communis</i>	Alimento (pêra)	O81355	Forte
A0A2C9UBP1	Profilin OS=Manihot esculenta	Ric c 8	<i>Ricinus communis</i>	Planta	B9RKF5	Forte
A0A2C9VCT2	1,4-alpha-glucan branching enzyme (Fragment)	Sac c Glucosidase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fungo	D6VQU5	Fraca
A0A2C9UKA2	Fructose-bisphosphate aldolase	Sal s 3	<i>Salmo salar</i>	Alimento (salmão)	COH911	Fraca
A0A2C9V9K5	Pyruvate kinase	Sal s 9	<i>Salmo salar</i>	Alimento (salmão)	A0A1S3PT31	Forte
A0A2C9W0S0	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	Sal k 3	<i>Salsola kali</i>	Planta	C1KEU0	Forte
A0A2C9VB98	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sola l SOD	<i>Solanum lycopersicum</i>	Alimento (tomate)	K4AX22	Forte
A0A2C9WMX8	Uncharacterized protein	Tri a 31	<i>Triticum aestivum</i>	Alimento (trigo)	Q9F579	Forte
V9M4U6	Dehydrin protein	Tri a 35	<i>Triticum aestivum</i>	Alimento (trigo)	Q0KIW1	Forte
A0A2C9WF26	Peroxidase OS=Manihot esculenta	Tri a Peroxidase 1	<i>Triticum aestivum</i>	Alimento (trigo)	Q8LK23	Fraca
A0A2C9V7A9	LRRNT_2 domain-containing protein	Tri a 23kd	<i>Triticum aestivum</i>	Alimento (trigo)	Q4W1G0	Forte
A0A2C9VWH6	Thioredoxin domain-containing protein	Tri a 25	<i>Triticum aestivum</i>	Alimento (trigo)	Q9LXD4	Fraca
A0A2C9VM37	Uncharacterized protein	Tyr p 28	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	Ácaro	A0A1B2YLJ2	Forte
A0A2C9UU85	Aldedh domain-containing protein	Tyr p 35	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	Ácaro	A0A1B2YLJ7	Forte
A0A2C9VAA7	Bet_v_1 domain-containing protein	Vig r 6	<i>Vigna radiata</i>	Alimento (feijão moyashi)	Q9ZWP8	Fraca
A0A251J8T0	Phosphopyruvate hydratase	Zea m 22	<i>Zea mays</i>	Alimento (milho)	P42895	Forte
A0A2C9UYJ5	Proteasome subunit alpha type	Zea m 20S	<i>Zea mays</i>	Alimento (milho)	Q5XML0	Fraca
A0A2C9VZ08	Proteasome subunit beta	Zea m 20S	<i>Zea mays</i>	Alimento (milho)	Q5XML0	Fraca
A0A251LDI6	Pectate_lyase_3 domain-containing protein	Zea m 13	<i>Zea mays</i>	Alimento (milho)	Q1ZYQ7	Fraca

Ainda com as 97 proteínas potencialmente mais alergênicas, foram realizadas análises no Panther 17.0, no qual as análises são realizadas a partir dos seus relacionamentos evolutivos para obtenção de informações sobre a classificação dessas proteínas quanto a sua função molecular, processo biológico e classe (Figura 4). Podemos observar que o principal processo biológico dessas proteínas está relacionado ao processo celular, que consiste em qualquer processo localizado em nível celular, mas não restrito a uma única célula, como por exemplo a comunicação que ocorre entre células. A principal função molecular é a atividade catalítica, que está relacionada com a temperatura fisiológica das reações bioquímicas. E a principal classe de proteínas são as enzimas de interconversão de metabólitos, que são responsáveis por converter uma

pequena molécula em outra. Essa classe inclui todas as enzimas, exceto aquelas que atuam no DNA, RNA ou em uma proteína como é o caso das hidrolases, isomerases e ligases.



**Figura 4 – Classificação das proteínas potencialmente mais alergênicas**

## 5.2 DETECÇÃO DOS ALÉRGENOS DA MANDIOCA E IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS REATIVIDADES CRUZADAS

Visto que todos os participantes do estudo relatavam sintomas de alergia não somente para mandioca, mas também para outros vegetais, (tabela 4) foi realizado o teste *prick to prick* com frutas e alguns vegetais, a depender do sintoma clínico relatado, para confirmação do diagnóstico.

No teste cutâneo para frutas e vegetais seis indivíduos foram positivos para pelo menos uma fruta ou vegetal (1, 4, 7, 8, 9 e 10), um apresentou dermatografismo (2) impedindo que se tire conclusão do teste realizado. O dermatografismo consiste em um tipo de urticária crônica induzida por contato físico, em que a aplicação de uma determinada pressão na pele do indivíduo resultará no aparecimento de pápula no trajeto da pressão exercida<sup>105</sup>. Indivíduo 4 apresentou positividade para tudo o que foi testado. Entre todos os alimentos testados o que mais apresentou positividade foi o mamão

(5/10) seguido de pêsego, abacaxi e abacate (2/10) para as demais frutas e vegetais testados apenas um individuo foi positivo.

**Tabela 4 – Teste cutâneo para frutas e vegetais que os indivíduos relataram sintomas clínicos**

Prick to Prick para frutas e vegetais												
Indivíduos	Mamão	Pêssego Inteiro	Pêssego Polpa	Pêssego Casca	Kiwi	Maracujá	Abacaxi	Abacate	Berinjela	Uva	Banana	Avelós
1	5x5 mm	5x5 mm	5x5 mm	4x3 mm	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Derm.	-	-	-	Derm.	-	-	Derm.	-	-	Derm.	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	6x3 mm	4x5 mm	4x3 mm	5x4 mm	7x6 mm	5x4 mm	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	6x4 mm	7x6 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	6x4 mm	7x5 mm
8	3x4 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	5x7 mm	-	-	-	-	-	5x5 mm	-	-	-	-	-
10	5x5 mm	Neg	-	-	Neg	-	-	4x4 mm	Neg	-	-	-

Positivo:  $\geq 3 \times 3 \text{ mm}$  Neg: Negativo

Foram realizados testes para IgE em ImmunoCAP para látex e seus componentes específicos e teste *prick to prick* para luva de látex em todos os indivíduos do estudo (Tabela 5). Para luva de látex dois foram negativos (2 e 5) e sete foram positivos (1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10). A maioria dos resultados entre ImmunoCAP e *prick to prick* foram concordantes, exceto os indivíduos 2 e 3. Por um lado, o indivíduo 3 possui teste negativo no ImmunoCAP e positivo no *prick to prick* já o indivíduo 2 apresentou um resultado oposto. Dos alérgenos específicos o que mais apresentou positividade foi *Hev b 5* (8/10) seguido por *Hev b 6* (4/10), *Hev b 1* (4/10), *Hev b 11* e *Hev b 3* (2/10). Nenhum dos indivíduos foi positivo para *Hev b 8*.

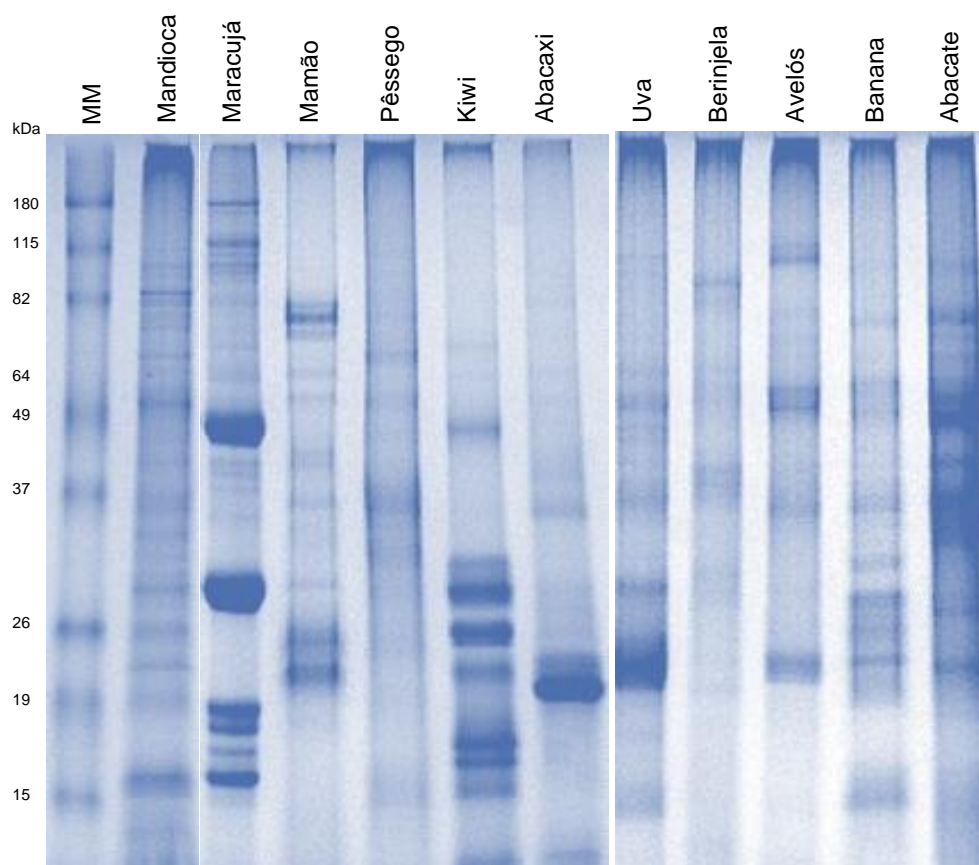
**Tabela 5 – Resultados de ImmunoCAP para látex e seus alérgenos específicos e prick to prick com luva de látex**

ImmunoCAP e <i>prick to prick</i> para látex e seus componentes									
Indivíduos	Látex	<i>Hev b 1</i>	<i>Hev b 3</i>	<i>Hev b 5</i>	<i>Hev b 6</i>	<i>Hev b 8</i>	<i>Hev b 11</i>	<i>Prick to Prick</i>	Alérgico a látex?
1	<b>8,45</b>	0,03	0	<b>8,76</b>	<b>0,89</b>	0	0,17	<b>6x7 mm</b>	<b>Sim</b>
2	<b>76,6</b>	0,02	0,03	<b>67,3</b>	<b>19,2</b>	0,03	1,2	Neg	Não
3	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	<b>3x3 mm</b>	<b>Sim</b>
4	<b>1,26</b>	0	0	1,0	0,17	0	0,04	<b>4x4 mm</b>	<b>Sim</b>
5	0,01	0	0	0	0	0,01	0,05	Neg	Não
6	<b>0,79</b>	0	0	<b>0,64</b>	0	0	0	<b>9x6 mm</b>	<b>Sim</b>
7	<b>20,9</b>	<b>0,83</b>	0	<b>27,5</b>	0	0	0,003	<b>5x4 mm</b>	<b>Sim</b>
8	<b>9,5</b>	0,33	<b>0,67</b>	<b>12,7</b>	<b>0,46</b>	0,001	0,05	<b>8x5 mm</b>	<b>Sim</b>
9	<b>30,3</b>	0,35	0,1	<b>4,16</b>	<b>38,6</b>	0,12	<b>5,91</b>	<b>11x7 mm</b>	<b>Sim</b>
10	<b>11,7</b>	<b>2,07</b>	<b>0,80</b>	<b>6,78</b>	0,10	0,10	0,10	<b>6x5 mm</b>	<b>Sim</b>

ImmunoCAP Positivo em negrito:  $\geq 0,35$  kUA/L - *Prick to prick*: Positivo em negrito:  $\geq 3 \times 3$ mm Neg: Negativo

A partir do resultado positivo no teste cutâneo foi realizada a extração proteica dos alimentos pelo método de fenol/acetona para visualização em gel de eletroforese e WB. A dosagem por Bradford pós extração mostrou os seguintes rendimentos proteicos: mandioca 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; maracujá 106  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; mamão 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; pêssago 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; kiwi 3,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; abacaxi 3,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; uva 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; berinjela 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; avelós 5,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; banana 2,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e abacate 5,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Houve a tentativa de extração de proteínas da luva de látex, porém, mesmo após diversas tentativas e diversos protocolos diferentes, não foi possível a extração de quantidades significativas de proteínas.

Os extratos obtidos foram utilizados em uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% para verificar a qualidade e diversidade de proteínas (Figura 5). É possível observar que a extração foi efetiva contemplando uma grande variedade de proteínas em todos os extratos.

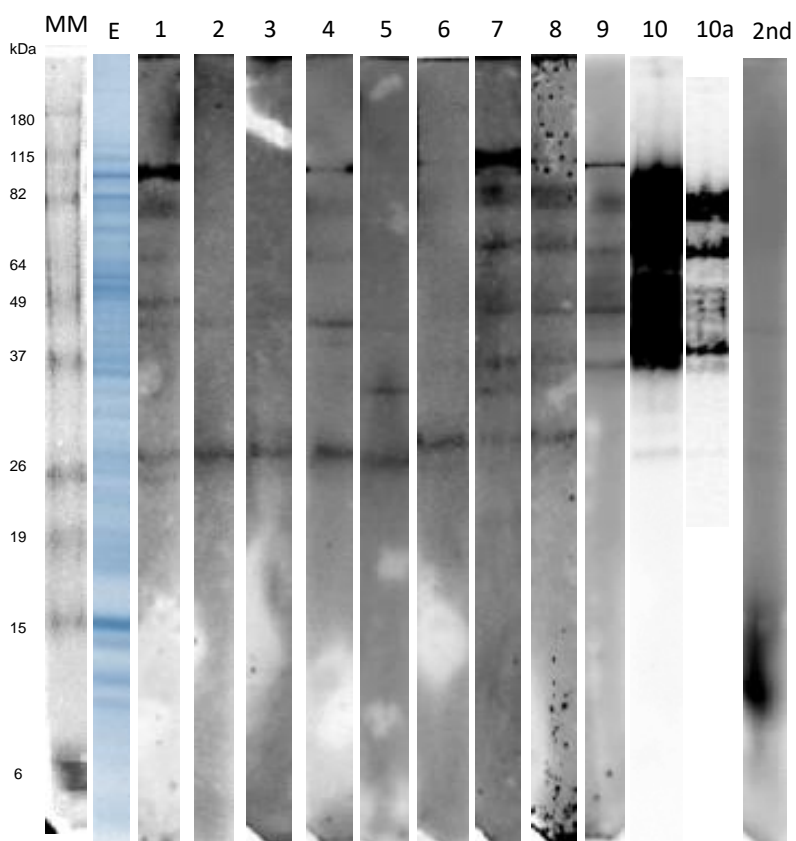


**Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% dos extratos de mandioca, frutas e vegetais que apresentaram positividade no teste cutâneo**

NOTA: MM: marcador molecular. kDa: kiloDalton.

Posteriormente, foi realizado WB com o soro de todos os indivíduos que apresentaram positividade para mandioca, frutas e vegetais para verificar a ligação de IgE com os respectivos extratos proteicos.

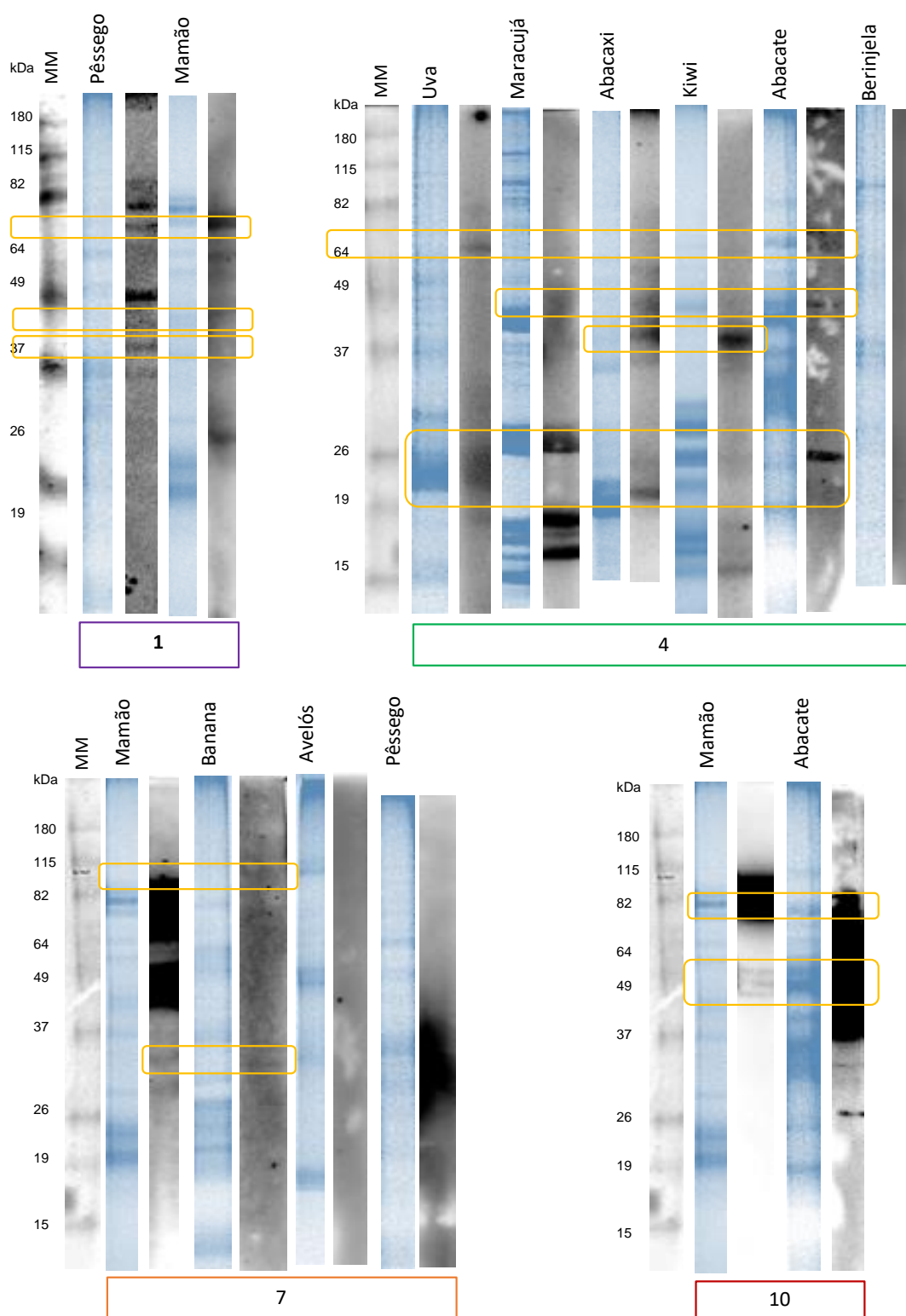
No WB com o extrato de mandioca (Figura 6) podemos observar que houve reconhecimento por IgE heterogêneo, em que as proteínas que apresentaram reatividade possuem massa molecular entre 25 e 115 kDa. Alguns indivíduos (1, 4, 7, 8, 9 e 10) apresentaram reatividade para uma diversidade maior de proteínas do que outros (2, 3, 5 e 6) que só reagiram a no máximo três proteínas do extrato, estando elas entre as massas moleculares de 30 e 49 kDa. Na região entre 24 e 30 kDa todos os indivíduos apresentam reatividade IgE, exceto, o indivíduo 9. Abaixo de 23 kDa não foi visualizado reconhecimento de bandas.



**Figura 6 – Western Blotting 1D com os dez indivíduos (1-10) alérgicos com extrato total de mandioca**

NOTA: MM: marcador molecular; E: eletroforese com o extrato de mandioca; 10a: *Western Blotting* indivíduo 10 com uma melhor visualização das proteínas; 2nd: controle anticorpo secundário; kDa: kiloDalton.

Para avaliar a reatividade IgE específica relatada e confirmada pelo teste *prick to prick* realizamos WB 1D. Os resultados dos WB 1D dos indivíduos que apresentaram reatividade a mais de um alimento foram agrupados na Figura 7 e assim pudemos observar que, para o indivíduo 1 em pêsego e mamão existe um reconhecimento proteico em comum nas regiões de 37, 40 e 60 kDa. O indivíduo 4, que apresentou positividade no teste cutâneo para uma maior variedade de alimentos, possui para uva, abacaxi e abacate bandas na região de 64 kDa em comum e para abacaxi e abacate na região de 45 kDa. No indivíduo 7, na região de 32 e 100 kDa houve reconhecimento comum em banana e mamão. E no indivíduo 10 houve forte reconhecimento IgE em mamão e abacate nas regiões de 49 e 82 kDa. Esse indivíduo foi bastante reativo para abacate nas regiões entre 40 e 50 kDa e em 80 kDa.



**Figura 7 – Western Blotting 1D com o extrato das frutas e vegetais para os indivíduos positivos no prick to prick agupados por indivíduo**

NOTA: Na região destacada em amarelo estão as bandas reconhecidas com a massa molecular similar em fontes diferentes. E: extrato total do alimento; MM: marcador molecular; 1-10: número dos indivíduos testados; kDa: kiloDalton.

Para verificar possíveis reatividades cruzadas entre os extratos totais da mandioca, das frutas e vegetais, foi realizado um WB de inibição, em que foram testadas diversas alterações no protocolo. Porém, nenhuma dessas alterações apresentou resultado significativo. Ainda assim, é válido continuar essa investigação modificando outros parâmetros ainda não testados como aumentar as concentrações dos extratos testados, aumentar a concentração do bloqueio da membrana para tentar minimizar ainda mais as ligações inespecíficas ou até mesmo utilizar outro material como BSA (albumina sérica bovina).

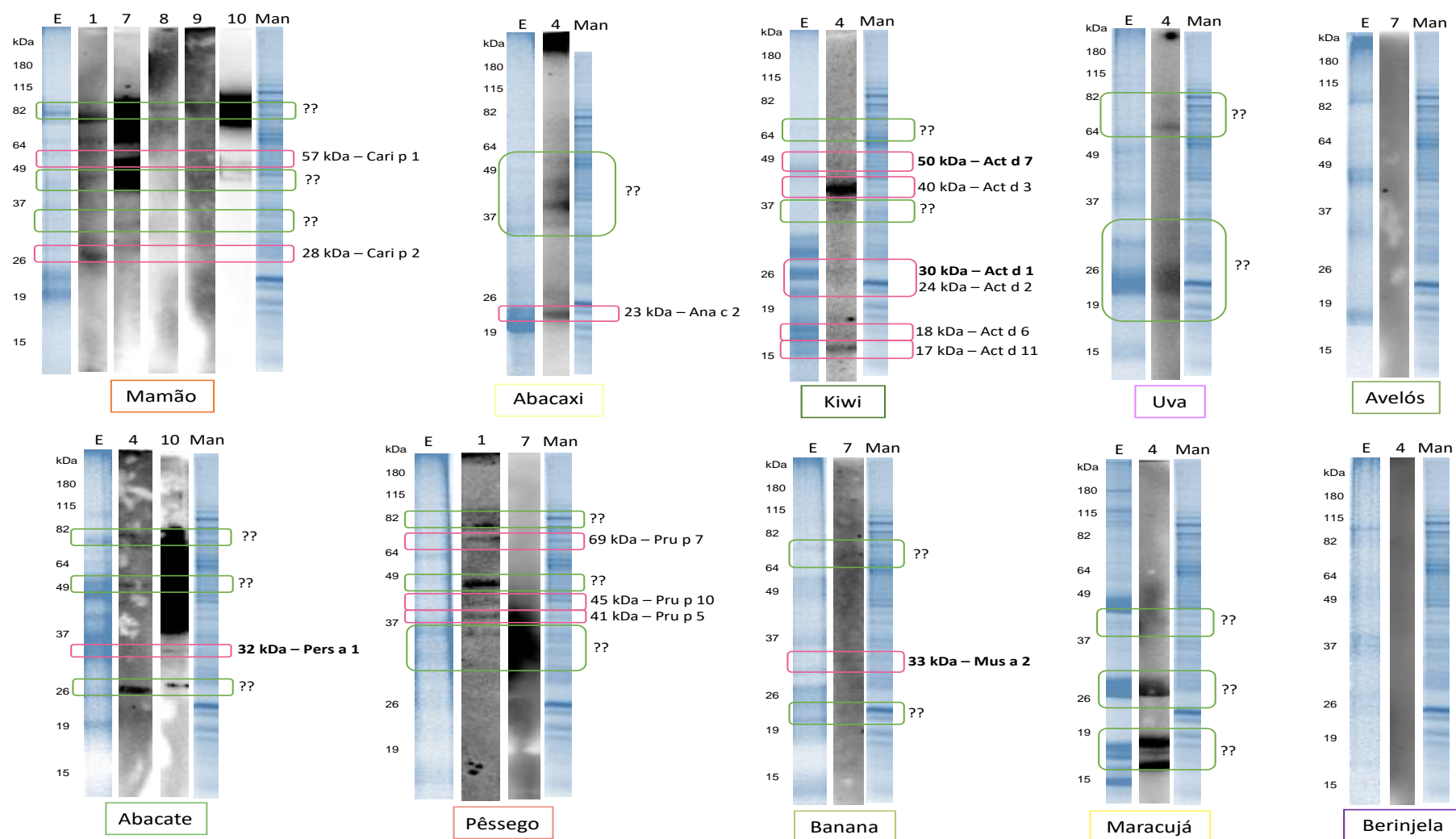
Para avaliar potencial reatividade cruzada da mandioca com as frutas testadas na figura 8 foi feito um alinhamento dos WB 1D agrupado por fruta juntamente com o extrato de mandioca. Podemos observar que onde houve reconhecimento de IgE, o mesmo foi heterogêneo e que, em várias regiões destacadas, há presença de proteínas em mandioca e nas frutas com massa molecular aproximada, indicando possível reatividade cruzada. Ao procurar na literatura quais alérgenos foram descritos até o momento para cada fruta em que foi visto reatividade IgE encontramos os seguintes achados. Para o mamão, fruta que mais apresentou positividade no *prick to prick*, todos os indivíduos testados apresentaram reatividade IgE na região de 80 kDa, que, até o momento, não há descrição de proteína IgE reativa. Três dos cinco indivíduos testados foram reativos nas regiões de 28 e 57 kDa podendo ser proteínas referentes aos alérgenos *Cari p 2* e *1* respectivamente. Para o abacaxi, na região de 23 kDa foi reconhecido o que pode ser *Ana c 1*. Para o kiwi, várias regiões foram reconhecidas podendo ser *Act d 11* (17 kDa), *Act d 6* (18 kDa), *Act d 2* (24 kDa) *Act d 1* (30 kDa) *Act d 3* (40 kDa) e *Act d 7* (50 kDa). Para o abacate em 32 kDa foi reconhecido por IgE o que pode ser *Pers a 1*. No pêssigo houve reatividade IgE em 41 kDa, podendo ser *Pru p 5* (alérgeno esse que possui semelhanças com *Man e 5* da mandioca<sup>106</sup>), e em 45 e 69 kDa podendo ser respectivamente *Pru p 10* e *7*. Em banana a única proteína identificada foi na região de 33 kDa que pode ser *Mus a 2*.

As regiões destacadas em verde na figura 8, são regiões que foram IgE reativas, mas que ainda não possuem descrição de alérgenos na literatura até o momento. Para berinjela e avelós (conhecido como cacto lápis e bastante utilizado como planta decorativa), não houve reatividade IgE para os indivíduos testados. Foram destacadas em negrito na figura 8 os alérgenos *Act d 1* e *7* (kiwi), *Pers a 1* (abacate) e *Mus a 2*



(banana), pois em nosso resultado de *shotgun* com o extrato total de mandioca (tabela 3) elas foram sinalizadas como homólogas para proteínas presentes em nosso extrato.

Apesar de o indivíduo 9 ter apresentado positividade para abacaxi no teste *prick to prick* não foi realizado WB com o extrato dessa fruta por falta de soro.

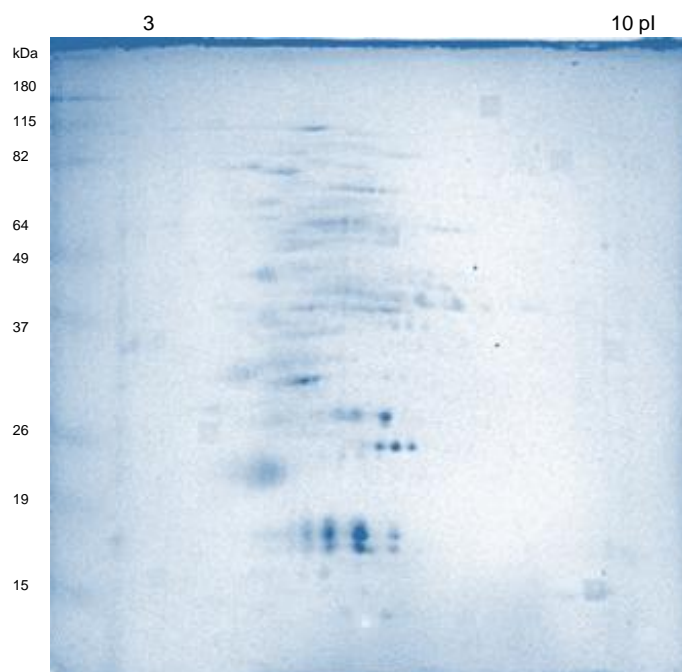


**Figura 8 – Western Blotting 1D com o extrato das frutas e vegetais que os indivíduos foram positivos no *prick to prick* agrupados por alimento**

NOTA: Destacados em rosa - alérgenos já descritos nessas fontes. Destacados em verde - sem descrição na literatura até o momento. Destacados em negro: proteínas homólogas encontradas no *shotgun* de mandioca. E: extrato total do alimento; Man: extrato total de mandioca; 1-10: número dos indivíduos testados; kDa: kiloDalton.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MANDIOCA IGE-REATIVAS

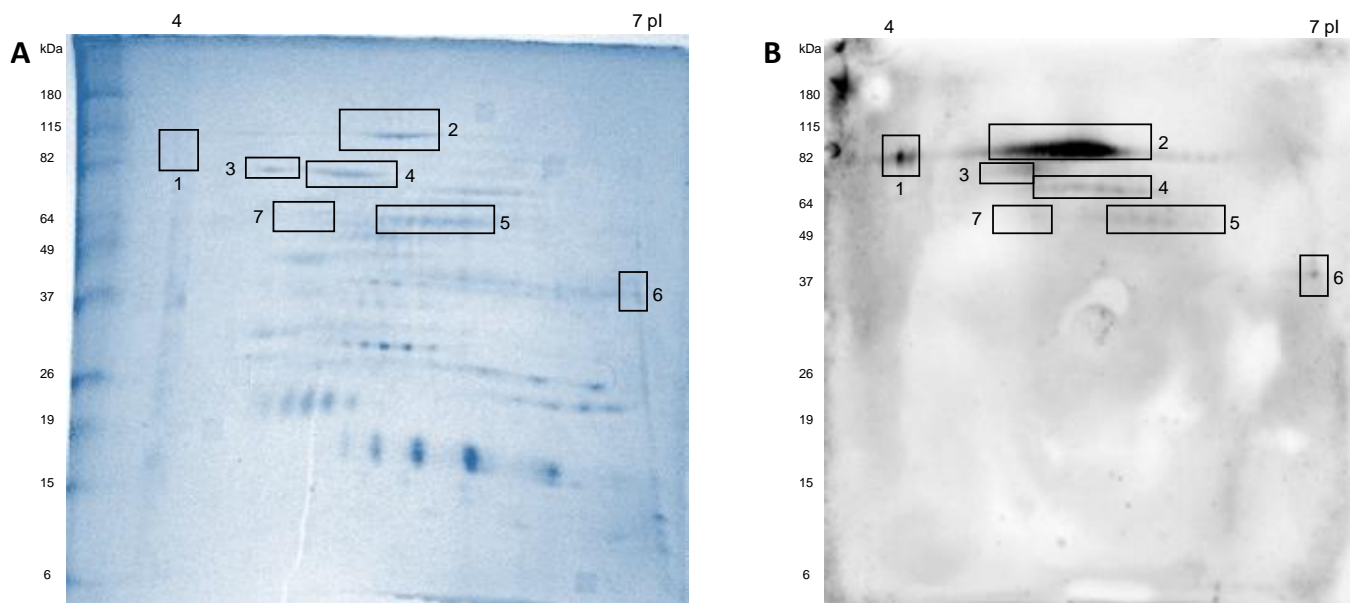
Para uma melhor visualização e separação das proteínas presentes no extrato total de mandioca foi realizada uma eletroforese 2D SDS-PAGE em gel de acrilamida 12%, com fita de 7 centímetros e ponto isoelétrico de 3 a 10 para fins de triagem (Figura 9). Com isso foi possível enxergar que a maioria das proteínas se encontravam entre os pontos isoelétricos de pH 4 a 7.



**Figura 9 – Eletroforese 2D SDS - PAGE em gel de acrilamida 12% do extrato de mandioca**

NOTA: pI: ponto isoelétrico; kDa: kiloDalton

Em seguida, portanto, foi realizado um segundo WB 2D SDS-PAGE em gel de acrilamida 12%, com o *pool* de soros dos indivíduos alérgicos agora com ponto isoelétrico de 4 a 7, a fim de investigar mais profundamente as proteínas reconhecidas. Foram detectadas sete regiões de spots com reconhecimento IgE-específico entre 110 e 39 kDa aproximadamente (Figura 10). Aparentemente, cada região conta com diferentes isoformas de uma mesma proteína, que aparecem no gel como spots distintos lado a lado por apresentarem diferentes pontos isoelétricos, por isso foram recortadas como sete regiões no gel para identificação.



**Figura 10 – Eletroforese e *immunoblotting* 2D SDS - PAGE com extrato de mandioca**

NOTA: Em A: Eletroforese 2D SDS – PAGE em gel de acrilamida 12% com extrato total de mandioca; Em B: *Western Blotting* com o pool de soros dos indivíduos alérgicos (1-10); 1-7 *spots* que foram excisados para posterior identificação. pI: ponto isoelétrico; kDa: kiloDalton

As sete regiões de *spots* que foram revelados na membrana foram excisadas e identificadas por espectrometria de massas (Tabela 6). É importante lembrar que géis de eletroforese podem apresentar oscilações em relação a sua massa molecular de até 10%, podendo ocorrer exceções e o desvio ser maior quando a proteína possui alguma anormalidade por modificação pós traducional como fosforilação e/ou glicosilação<sup>107</sup>.

Ao compararmos a massa molecular e ponto isoelétrico experimentais com os teóricos, podemos observar que eles são bastante semelhantes. Alguns deles já foram identificados como IgE reativas em outras fontes, como é o caso dos *spots* 6, que correspondem à FBA e ao GAPDH e 7, que corresponde à *ATP synthase*. Os demais *spots*, 1 e 2 correspondendo à *alpha-1,4 glucan phosphorylase* (AGP), 3 e 4 à *peptidase\_S9* e 5 ao *cytosol\_AP*, até o momento não possuem descrição como alérgenos na literatura.

**Tabela 6 – Identificação das proteínas reativas a IgE no WB 2D SDS-PAGE e seus respectivos alérgenos já descritos e relatos na literatura de reatividade IgE**

<i>Spot</i> <sup>a</sup>	Cód. de Acesso <sup>b</sup>	Identificação	Organismo	Função	PU <sup>c</sup>	Experi. MM/pI <sup>d</sup>	Teor. MM/pI <sup>e</sup>	Descrito como alérgeno <sup>f</sup>	Relatado como IgE reativo
1-2	A0A2C9WB58	Alpha-1,4 Glucano Fosforilase	<i>Manihot esculenta</i>	Metabolismo de carboidrato	2-3	100/4	107/5.94	—	—
3- 4	A0A251IQB4	Peptidase_S9	<i>Manihot esculenta</i>	Proteólise	19-36	72/5-6	74/5.04	—	—
5	A0A2C9VFN2	Cytosol_AP	<i>Manihot esculenta</i>	Proteólise	33	60/6,5	60/6.69	—	—
6	A0A2C9VH59	Fructose Biphosphate Aldolase	<i>Manihot esculenta</i>	Glicólise	9-4	37/7	38/6.91 36/7.73	GAPDH: <i>Pan h 13</i> (peixe); <i>Per a 13</i> (barata); <i>Tri a 34</i> (Trigo)	FBA: barata; camarão; atum, salmão e bacalhau; trigo
	A0A2C9VQ42	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase		Oxidoredutase					GAPDH: látex; macadâmia; em plantas como <i>Plantago lanceolata</i> e <i>Canabis sativa</i>
7	A0A2C9UKP7	ATP Synthase	<i>Manihot esculenta</i>	Síntese de ATP	10	55/6	60/6.26	—	Pólen e <i>Canabis sativa</i>

a Número do *spot* identificado na figura 10.

b Número de acesso no Uniprot.

c Peptídeos únicos.

d Massa molecular (MM) em kDa e ponto isoelétrico (pI) experimentais.

e Massa molecular e ponto isoelétrico teóricos. Retirados de ExPASy.org.

f Alérgenos reconhecidos IUIS.

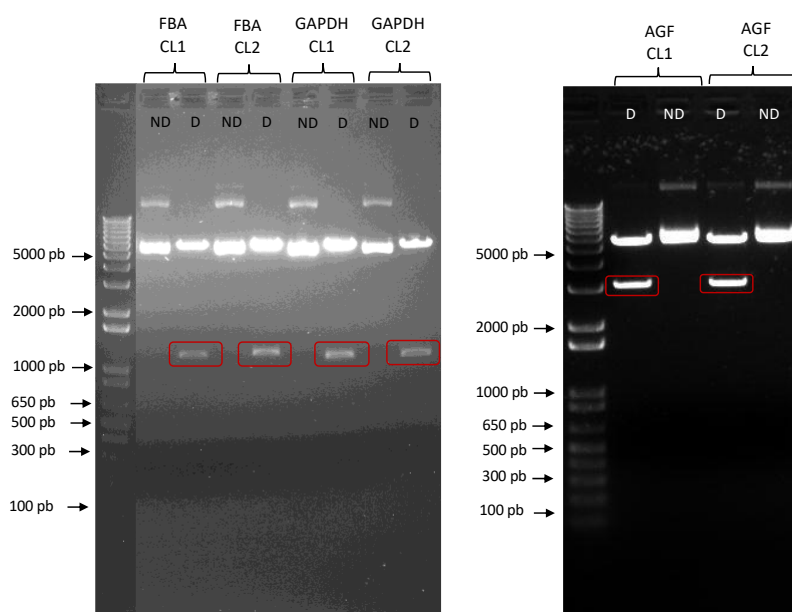
\*:108-116

Ao correlacionarmos essas identificações com o WB 1D individual (Figura 5) podemos ver que na região de 37 kDa onde foi identificado FBA e GAPDH apenas dois indivíduos (5 e 7) apresentaram reatividade IgE. Já, na região entre 55 e 60 kDa onde encontram-se *ATP synthase* e *cytosol\_AP*, quatro indivíduos (7, 8, 9, e 10) foram reativos. Cinco indivíduos (1, 7, 8, 9 e 10) reconheceram uma proteína na região de 74 kDa, que pode ser a *peptidase\_S9* e seis indivíduos (1, 4, 6, 7, 8 e 9) reconheceram uma banda na região de 100 kDa que pode ser a AGP.

#### 5.4 PRODUÇÃO DOS ALÉRGENOS

Devido as proteínas FBA e GAPDH já terem sido identificadas anteriormente como alérgenos de mandioca, selecionamos ambas e a proteína AGP (proteína que mais apresentou reatividade IgE no WB 2D) para produção de moléculas recombinantes.

Os plasmídeos foram transformados em bactéria *E. coli* e, após a transformação foram selecionados dois clones de cada proteína transformada para posterior extração e purificação do DNA plasmidial. O plasmídeo de FBA possui um tamanho de 1.164 pb, de GAPDH 1.101 pb e de AGF 2.937 pb. Cada clone extraído foi submetido à digestão enzimática específica para linearização do plasmídeo. Uma eletroforese em gel de agarose 1,5% foi utilizada para confirmar se a digestão com as enzimas de restrição estava sendo efetiva (Figura 11).

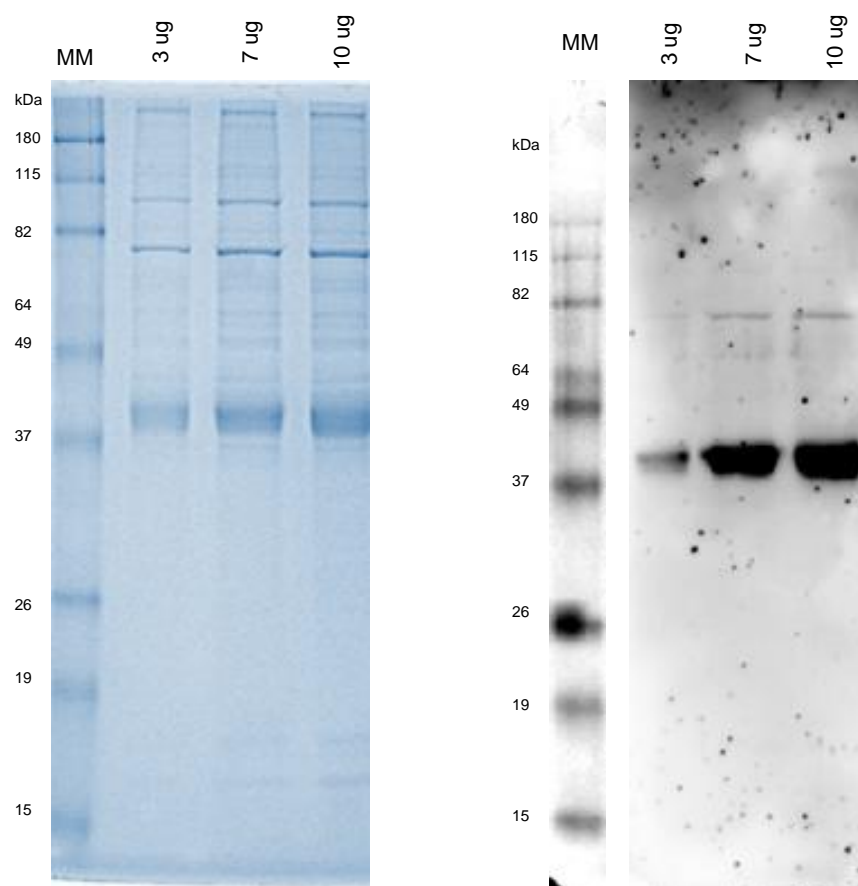


**Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% com os clones transformados em *E. coli***

NOTA: FBA: fructose bifosfato aldolase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; AGF: alfa-1,4 glucan fosforilase; CL 1 e 2: clone 1 e 2; D: digerido; ND: não digerido; pb: pares de bases

O DNA plasmidial extraído, purificado e digerido, foi utilizado para transfecção em células eucarióticas Expi293 para produção das respectivas proteínas. Foram transfectadas  $3 \times 10^6$ /mL células para cada plasmídeo, porém apenas FBA foi expressa em quantidade e qualidade suficiente para os experimentos subsequentes. Após expressão a proteína foi purificada em coluna de níquel.

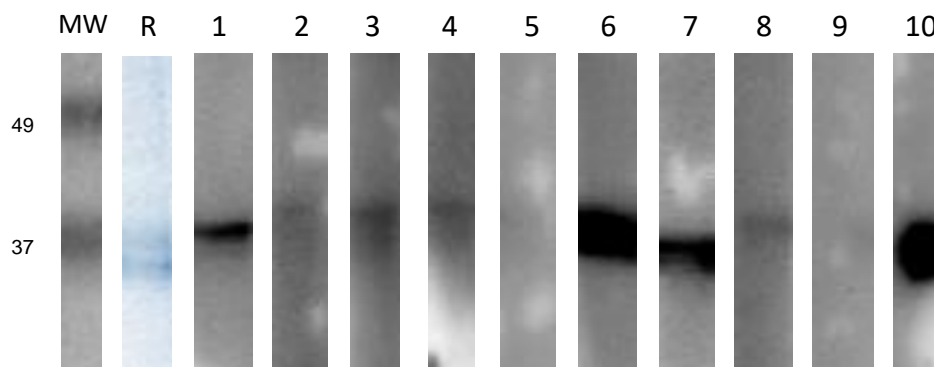
Para testar a proteína recombinante produzida, foi realizado uma eletroforese 1D SDS-PAGE em gel de acrilamida 12% e um WB com um *pool* de soro dos indivíduos alérgicos a mandioca (1-10) com três concentrações diferentes (3, 7 e 10  $\mu$ g) de FBA (Figura 12).



**Figura 12 – Eletroforese e *immunoblotting* com FBA recombinante**

NOTA: Em A: Eletroforese 1D SDS PAGE em gel de acrilamida 12% com a proteína recombinante frutose bifosfato aldolase em diferentes concentrações; Em B: *Western Blotting* com *pool* dos indivíduos alérgicos a mandioca (1-10)

Utilizando a concentração de 3  $\mu$ g de FBA, foi realizado um WB com os soros dos indivíduos alérgicos a mandioca separadamente para melhor visualização de reatividade IgE em nossa coorte (Figura 13). Pode-se observar que dos 10 indivíduos testados, 8 apresentaram alguma reatividade IgE para FBA.

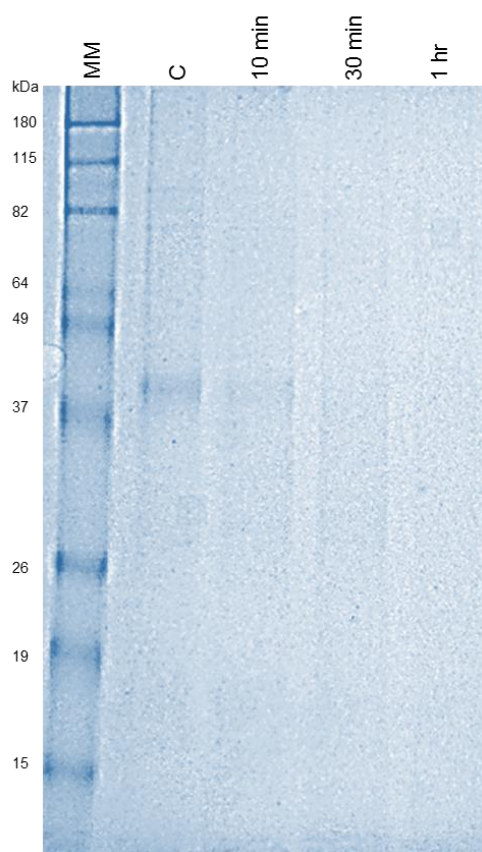


**Figura 13 – Western Blotting com proteína recombinante fructose bifosfato aldolase (FBA) com indivíduos alérgicos a mandioca (1-10)**

NOTA: R: FBA recombinante em gel de acrilamida 12%; MM: marcador molecular; kDa: kiloDalton.

Além disso, foi realizada uma simulação gástrica com a enzima pepsina com a proteína recombinante FBA para verificarmos quanto tempo ela demoraria para se degradar em um ambiente em que o pH é próximo ao do estômago. Podemos observar que após 10 minutos de incubação se inicia a digestão parcial de FBA e no tempo de 30 minutos ainda é possível ver algum resquício de proteína. No tempo de 1 hora já não há mais detecção de proteína intacta (Figura 14).





**Figura 14 – Simulação gástrica com pepsina com a proteína recombinante frutose bifosfato aldolase em gel SDS - PAGE 12% acrilamida**

NOTA: MM: Marcador molecular; C: controle proteína não digerida com pepsina; 10min, 30min e 1 hr - tempo de incubação a 37°C com a enzima pepsina; kDa: kiloDalton.

## 6 DISCUSSÃO

Através de abordagens proteômicas, identificamos neste estudo seis novos alérgenos de mandioca, sendo que quatro deles aparecem pela primeira vez como IgE reativos para este alimento e os outros dois já foram vistos em trabalho anterior do grupo. Até o momento, a literatura descreve apenas o desenvolvimento de alergia a mandioca em que a sensibilização primária se dá pelo contato prévio com o látex. Porém, neste estudo descrevemos um alérgeno com possível capacidade sensibilizante primária.

As análises por *shotgun* nos mostraram uma grande variedade de proteínas presentes no extrato com potencial alergênico. Segundo nossas análises no banco de alérgenos AllerCatPro 2.0, foram identificados sete homólogos de alérgenos de látex em nosso extrato, o que já era esperado, visto que a mandioca também pertence à família das Euforbiáceas e que a reatividade cruzada entre mandioca e látex já está descrita<sup>69</sup>. Os dois vegetais em questão estão diretamente relacionados quanto ao seu ancestral comum de acordo com a sua taxonomia. Os alérgenos de látex que foram encontrados como homólogos no extrato de mandioca foram: *Hev b 3, 4, 9, 10* descritos até o momento como alérgenos com menor relevância clínica<sup>117</sup> e CyP, HSP80 e Trx que, até o momento não foram descritos como alérgeno pela nomenclatura da IUIS (*International Union of Immunological Societies*), mas foram identificadas por abordagens proteômicas com reatividade de IgE<sup>112,118</sup>.

Foram identificadas proteínas na mandioca com potencial alergênico em outros alimentos, como abacate, kiwi, banana, trigo e milho. Em todas essas frutas foram identificadas proteínas homólogas no extrato total de mandioca. Interessantemente ao observarmos as bandas detectadas no WB para as frutas podemos estabelecer semelhanças entre estas e as proteínas identificadas por *shotgun*. Vemos que para abacate, por exemplo, existe uma banda ao redor da massa molecular do *Pers a 1*, que foi identificado no *shotgun*. De forma similar temos bandas detectadas na região correspondente aos alérgenos *Act d 1* e *Act d 7*, bem como uma banda ao redor de 60 kDa para banana, correspondente a um monômero da catalase, todas identificadas no *shotgun*. Essas proteínas podem ser novos alérgenos de reatividade cruzada entre a mandioca e essas frutas e que já estão descritos como alérgenos sensibilizantes alimentares.

O trigo (*Triticum aestivum*), além de ser um alimento sensibilizante por via oral, também pode desencadear resposta IgE por via inalatória e teve quatro alérgenos homólogos aqui identificados. *Tri a 31* e *35*, alérgenos inalatórios encontrados nas sementes, o *Tri a 23 kDa*, proteína rica em leucina não reconhecida pela nomenclatura IUIS até o momento<sup>117,119</sup>, e *Tri a peroxidase 1*, descrita como IgE-reativa relacionada à asma e dermatite de contato do padeiro além de alergias alimentares relacionadas ao trigo<sup>120,121</sup>.

Foram encontrados quatro homólogos de alérgenos de milho (alimento que está entre os mais sensibilizantes para a população brasileira<sup>19</sup>). Entre os alérgenos estão *Zea m 13*, relacionado com alergia ocupacional em indivíduos que trabalham em contato com pólen do milho<sup>122</sup>, *Zea m 22*<sup>123</sup> e *Zea 20S*<sup>124</sup>, todos descritos como IgE reativos, mas não totalmente caracterizados até o momento. Os indivíduos que participaram deste estudo não apresentam reação alimentar ao trigo ou milho, mas é interessante observar que as proteínas relacionadas identificadas são alérgenos inalatórios, com casos de relato de alergia ocupacional. A mandioca também poderia apresentar essa propriedade, visto que pode ser transformada em farinha, mas nenhum dos participantes tem contato inalatório com a mandioca. Houve um caso no ambulatório de Alergia e Imunologia do HCFMUSP, há mais de uma década, em que em um caso índice de dessensibilização à mandioca, um indivíduo do sexo feminino apresentou reação inalatória com mandioca (comunicação pessoal, dados não publicados).

Dois fungos possuem alérgenos semelhantes às proteínas da mandioca, *Aspergillus fumigatus* (*Asp f 28*, FDH, MDH, DPPV, glucosidase) e *Alternaria alternata* (*Alt a 7, 10 12*, TCTP), ambos amplamente encontrados na natureza. Dentre todos os possíveis homólogos, apenas dois apresentam forte evidência alergênica, *Asp f MDH*, identificada como malato desidrogenase, e *Alt a 12*, identificada como proteína ribossomal ácida P1, outra vez, ambas sensibilizantes inalatórias<sup>125,126</sup>.

Foram identificados possíveis homólogos de ácaros de *Dermatophagoides farinae* e *pteronyssinus* (*Der f 29, 31, 34*, EF, *Der p 32*), quase todos, exceto *Der f 29*, apresentaram forte evidência de alergenicidade. Esses ácaros podem ser encontrados na poeira doméstica e são as causas mais comuns de alergia no mundo, porém não estão relacionados apenas a sensibilizações inalatórias, mas também por via oral ou por ingestão de invertebrados que possuem reatividade cruzada, como é o caso de crustáceos (camarão, lagosta, caranguejo), insetos (barata e gafanhoto) e moluscos

(ostras e lulas), ou, até mesmo, por alimentos contaminados por ácaros devido ao armazenamento inadequado em temperatura ambiente, principalmente em farinhas e grãos<sup>127</sup>. Como já mencionado, apesar de ser possível que a mandioca tenha proteínas com potencial de sensibilização inalatória, essa não é a via comum de contato para esse alimento. O látex, no entanto, possui reatividade cruzada já descrita e, apesar de ser um sensibilizante por contato, a sensibilização por via inalatória devido ao pó das luvas já foi descrita<sup>128</sup>. Vale destacar que 70% da nossa coorte é composta de profissionais da área de saúde.

Ao compararmos a classificação das proteínas com *H. brasiliensis*, para a ontologia de função molecular, assim como na mandioca, a maior variedade de proteínas possui atividade catalítica, seguido de proteínas com função de ligação. No processo biológico a maior parte está relacionada ao processo metabólico, seguido de processo celular, porém em mandioca é o oposto<sup>129</sup>, o que reforça a proximidade taxonômica e as diferenças entre elas.

Curiosamente, nossa coorte é composta apenas por mulheres, o que pode ser explicado pelo fato de mulheres, em geral, buscarem os serviços de saúde duas vezes mais quando comparados aos homens e ao fato, já mencionado anteriormente, de nossa coorte apresentar 70% de profissionais de saúde, principalmente da classe de enfermagem, em que, estatisticamente, também prevalece o sexo feminino<sup>130,131</sup>. Porém, já foi descrito que o estrógeno pode influenciar em sintomas de alergia alimentar e, nos casos de asma, já foi comprovado que esse hormônio tem papel agravante, enquanto a testosterona tem papel protetor<sup>132</sup>. Além disso, a maior permeabilidade da barreira cutânea e mucosa e a menor capacidade metabólica feminina podem ser decisivas para o desenvolvimento e gravidade da reação alérgica, visto que mais alérgenos acabam sendo absorvidos<sup>133,134</sup>.

Ao analisarmos os resultados do teste *prick to prick* para mandioca, látex, frutas e vegetais, sete indivíduos foram positivos para látex e, desses, cinco foram positivos para mamão também. A associação entre reações mamão-látex, segundo a literatura, não é muito comum, mas foi visto num estudo de 2018, em que a hipersensibilidade ao mamão pode aumentar o risco de anafilaxia em indivíduos alérgicos a látex<sup>135</sup>.

Ao analisarmos os resultados de ImmunoCAP para látex e seus componentes individuais, podemos observar que apenas dois indivíduos não possuem sensibilização para látex (3 e 5). No teste *prick to prick*, o indivíduo 3 possui resultado positivo para

látex muito próximo do valor de referência, sendo necessário um novo teste para confirmação, e o indivíduo 5 é negativo para látex. Ambos não apresentam história de alergia para nenhuma outra fruta ou outro vegetal. No entanto, no WB para mandioca ambos apresentaram bandas IgE-reativas, podendo ser a primeira descrição de sensibilização primária por mandioca.

Dois indivíduos possuem resultados discordantes de ImmunoCAP e *prick to prick* para látex. O indivíduo 2 possui ImmunoCAP positivo e teste cutâneo negativo e indivíduo 3 o perfil oposto. Curiosamente, o indivíduo 2 teve valores muito altos tanto para o extrato total, quanto para *Hev b 5* e *Hev b 6*. O indivíduo 3, no entanto, apresentou teste cutâneo positivo no menor tamanho de pápula. A reação na pele poder ser explicada por ligação à molécula de CCD, que se liga à IgE, apresentando um resultado falso positivo<sup>136</sup>. As moléculas presentes no Immunocap, porém, não apresentam esse domínio. A resposta imune do sangue diferente da pele, pode ser explicada por uma resposta dominante de IL-10, o que pode levar a menos IgE ligadas em mastócitos na pele<sup>137</sup>. Para os demais, todos possuem alergia a látex, frutas e/ou vegetais concomitante à mandioca e, em sua maioria, apresentam um perfil de reconhecimento IgE mais rico em quantidade de proteínas.

Quando analisamos os WB 1D individuais para mandioca podemos observar que o perfil de sensibilização não é o mesmo para todos. Aqueles que não possuem reatividade IgE para látex ou outras frutas e vegetais (2, 3, 5 e 6) possuem um perfil de sensibilização para uma quantidade menor de proteínas que os demais, que apresentam um perfil mais rico em proteínas com massa molecular entre 25 e 115 kDa. A proteína que mais apresentou reconhecimento tem massa molecular ao redor de 30 kDa, previamente descrita como *Man e 5*, já é sabido que ela possui reatividade cruzada com *Hev b 5* do látex<sup>69</sup>. Apesar de o WB 1D não ter resolução suficiente, pode-se sugerir que, em nossa coorte, ele é um alérgeno altamente sensibilizante.

Avaliando concomitantemente os resultados dos testes *in vitro* para os indivíduos que possuem alergia a frutas, podemos observar que o indivíduo 1, além de alergia a mandioca confirmada, possui reatividade clínica com mamão e pêssigo, o que foi confirmado em teste cutâneo com as respectivas frutas *in natura*. No WB 1D com as frutas, realizado para verificar quais proteínas exibem reatividade IgE, foi possível visualizar bandas nas regiões de 82 a 37 kDa para mamão e pêssigo e, até o momento, não foram descritos alérgenos com essa massa molecular para nenhum desses alimentos.

Em pêssigo houve reconhecimento na região de 40 kDa, em que, recentemente, foi descrito um novo alérgeno denominado *Pru p 5* com massa molecular de 41 kDa. Com identidade superior a 47% com *Man e 5* e 57% com *Hev b 5*<sup>106</sup>, é um alérgeno que possui quantidade variável em diferentes cultivares e safras dessa fruta, o que pode afetar a prevalência de sensibilização e de indivíduos que apresentam reatividade clínica a esse alérgeno<sup>106</sup>.

Indivíduo 4, de todos do estudo, é o que apresenta reação clínica com maior variedade de alimentos, todos confirmados em teste cutâneo. Ao compararmos o reconhecimento entre as frutas, podemos ver que a ligação de IgE mais forte é com maracujá, fruta essa que possui descrição de que uma proteína alergênica de 30 kDa da família das quitinases (*Pas e chitinase*), que estaria envolvida na reatividade cruzada com *Hev b 6* do látex<sup>138</sup>. Podemos considerar que existe a possibilidade de reatividade cruzada entre maracujá e mandioca levando em consideração sua ancestralidade próxima. Em uva podemos ver ligação de IgE nessa mesma região e, por massa molecular, podemos aferir que possa ser *Vit v Chi4*, proteína pertencente a família da endocitina, alergênica tanto na fruta de forma natural como em forma de vinho (não envelhecido). Para ela, é sugerido que exista uma reatividade cruzada com *Hev b 6*, já bem estabelecida na síndrome látex-fruta<sup>139</sup>, assim como já foi descrito para abacate<sup>140</sup>.

Indivíduo 7 apresentou reatividade clínica com o arbusto avelós (*E. tirucalli*), sendo relatado que, logo após seu consumo, foi desencadeada anafilaxia. O teste cutâneo realizado com o avelós foi positivo. Porém, ao realizar o WB 1D com extrato total o resultado foi negativo. Acreditamos que a razão de não ter sido possível ver reatividade IgE nos testes *in vitro* com avelós tenha se dado pela falta de látex na amostra do arbusto enviada ao laboratório, sendo o extrato realizado com o arbusto praticamente seco. No WB para mamão foi possível observar forte reatividade IgE na região de 82 a 64 kDa e de 49 a 38 kDa, não sendo possível identificar ao certo a qual proteína exatamente houve ligação IgE, e nas regiões de 30 kDa e de 25 kDa. Sabe-se que esta fruta está relacionada a síndrome látex fruta<sup>141</sup> e que, até o momento, existe descrição de duas proteínas com massa molecular próximas a essas regiões, *Cari p 1*<sup>142</sup> com 56 kDa e *Cari p 2*<sup>143</sup> com 28 kDa, ambas reconhecidas como alérgenos pela IUIS e sensibilizantes tanto por via inalatória quanto por ingestão. Em banana, foi visto uma reatividade de IgE na região de 33 kDa, onde já foi descrito um alérgeno, *Mus a 2*, uma quitinase de classe I que também é bastante importante no abacate. A alergia provocada

por ingestão ou até mesmo manipulação de banana também está associada a indivíduos alérgicos a látex<sup>144</sup>. Em pêssego não foi possível enxergar nenhuma reatividade.

Indivíduo 10, possui teste cutâneo para mandioca, látex, mamão e abacate positivos. Em seu WB 1D para mamão, houve forte reconhecimento na região de 82 kDa e de 49 a 40 kDa. Em abacate houve reconhecimento na região de 82 a 37 kDa, não sendo possível identificar a quais proteínas houve ligação de IgE, e da região de 32 e de 26 kDa. Na região de 32 kDa já existe descrição de um alérgeno, *Pers a 1*, uma endoquitinase que também está relacionada com reatividade cruzada com látex<sup>145</sup>. Como mencionado anteriormente, essa proteína também foi identificada no extrato total na análise por *shotgun*.

Ao analisarmos o WB 1D de frutas e vegetais podemos ver que todas as frutas testadas apresentaram alguma reatividade IgE, exceto, avelós e berinjela e podemos inferir, por massa molecular, quais poderiam ser as proteínas reconhecidas. Sugerimos que os indivíduos dos nossos estudos reconhecem em banana (*Mus a 2* – 33 kDa) e em abacate (*Per a 1* – 23 kDa) uma quitinase de classe I encontrada em fontes distintas. Esta proteína possui um domínio semelhante ao *Hev b 6* de látex<sup>144</sup>, indicando que pode ocorrer reatividade cruzada entre elas. O mesmo vemos com *Cari p 1* do mamão (57 kDa) e *Pru p 10* de pêssego (45 kDa), ambas identificadas como endopoligalacturonase, enzima com função de degradar pectinas envolvidas no amadurecimento dos frutos<sup>142</sup>. As demais proteínas não foram correlacionadas entre si, porém, não podemos descartar a possibilidade de estarem contempladas em outras fontes devido a falta de descrição de mais alérgenos para essas frutas, o que demonstra a importância do desenvolvimento de mais estudos nesta área.

Em nossa análise de *shotgun* com extrato de mandioca foram encontradas proteínas homólogas de abacate (*Pers a 1*) e kiwi (*Act d 1* e 7) e os dois indivíduos que relataram alergia para essas frutas apresentaram reatividade IgE para proteínas com massa molecular correspondente, o que nos mostra que pode existir reatividade cruzada entre esses alimentos. Além disso, o indivíduo 4 possui reatividade para as duas frutas. *Pers a 1* (32 kDa) pertence a família das endoquitinases, que é um grupo de proteínas importante em diversos vegetais e pólenes, pois fazem parte do sistema básico de defesa das plantas contra o ataque de fungos. Ela é o principal alérgeno do abacate e possui reatividade cruzada com *Hev b 6* do latex já descrita<sup>145</sup>. *Act d 1* (30 kDa) é uma actinidina, principal alérgeno de kiwi e compõe 50% das proteínas solúveis presentes na

fruta. Esta proteína possui grandes chances de apresentar reatividade cruzada com o grupo tiol protease de outras frutas como por exemplo bromelaína (*Ana c 2*) do abacaxi e papaína (*Cari p 2*) do mamão devido a sua alta semelhança<sup>146</sup>. *Act d 7* (50 kDa) é uma glicoproteína denominada pectina metilesterase e possui 57% de identidade com *Lyc e* de tomate. MUXF3 é um peptídeo que carrega o oligossacarídeo ligado a *Ana c 2* e, a partir dessa proteína, ele é purificado, digerido e amplamente utilizado como marcador da presença de IgE específica para CCD. Também é utilizado como inibidor para avaliar o co-reconhecimento entre o seu glicano e o de outras glicoproteínas. Experimentos de inibição realizados com soros contendo IgE específica para CCD, demonstraram uma inibição total de MUXF3 em *Act d 7* e uma inibição de *Act d 7* no precursor de MUXF3, *Ana c 2*<sup>147</sup>.

Curiosamente, todos os indivíduos do nosso estudo que são alérgicos a mamão reconheceram a proteína com a massa molecular ao redor de 82 kDa, mas até o momento não há descrição de proteína IgE reativa com essa massa molecular como alérgeno.

Para investigar mais profundamente essas outras proteínas reativas a IgE em mandioca foi realizado uma eletroforese e WB 2D SDS-PAGE com o extrato total e *pool* dos soros dos indivíduos alérgicos. Podemos observar que foram reconhecidas seis proteínas com massa molecular superior a 35 kDa, as quais foram excisadas do gel e identificadas por espectrometria de massas. Nota-se que o perfil observado no WB 1D não se repete no WB 2D, isso se deve às etapas pelas quais passam a amostra para a realização de eletroforese bidimensional, as quais podem interferir no reconhecimento das IgE pelas proteínas, o que pode justificar que as proteínas IgE-reativas abaixo de 35 kDa reconhecidas no 1D não terem sido detectadas no 2D.

Dentre as proteínas identificadas, duas já haviam sido descritas como alérgenos em mandioca: FBA e GAPDH<sup>70</sup>. Outras quatro foram identificadas pela primeira vez neste estudo: AGP, *peptidase\_S9*, *cytosol\_AP* e *ATP synthase*. Três delas ainda não foram descritas como IgE-reativas em nenhuma outra fonte até o momento: AGP, enzima conhecida por desempenhar papel na síntese e degradação do amido, associada ao metabolismo de carboidratos e energia, ela pode ser encontrada em abundância em frutas verdes, como manga e banana, em que sua presença está relacionada ao processo de amadurecimento<sup>148,149</sup>; *Peptidase\_S9*, enzima ligada à proteólise<sup>150</sup>; e a *cytosol\_AP*, que possui função molecular relacionada à atividade da metaloaminopeptidase<sup>151</sup>.



A proteína *ATP synthase*, proteína que, além de ser responsável pela síntese de ATP, está envolvida na regulação da morte celular vegetal<sup>116</sup>, já foi descrita como alérgeno no pólen<sup>116</sup> e na *Cannabis sativa*<sup>115</sup>. GAPDH foi identificada como a proteína com 36 kDa, é homóloga de: *Man i 1*, um alérgeno *major* de manga que possui 40 kDa<sup>152</sup>, *Pan h 13*<sup>153</sup> de bagre listrado, *Per a 13*<sup>154</sup> de barata americana e *Tri a 34*<sup>155</sup> de trigo. Além disso, foi relatada como uma proteína IgE-reativa do látex<sup>112</sup>, macadâmia<sup>113</sup>, bananeira<sup>114</sup> e também *Canabis sativa*<sup>115</sup> embora não seja considerada pela IUIS nessas fontes. Esta proteína está fortemente envolvida na glicólise/gliconeogênese e fixação de carbono em plantas fotossintéticas como parte do ciclo redutivo da pentose fosfato para o metabolismo energético<sup>113</sup>.

Já FBA já foi descrito como alérgeno em diversas fontes, sendo pela primeira vez em barata<sup>108</sup>, além do camarão<sup>109,156</sup>, em que foi relacionada a anafilaxia após atividade física<sup>157,158</sup>, outros frutos do mar<sup>110</sup>, vespa<sup>159</sup> e na farinha de trigo, em que está fortemente relacionada à asma do padeiro, uma das causas mais comuns de asma ocupacional causada pela inalação da farinha de trigo<sup>160</sup>. Possui conformação tetramérica nativa, é lábil e as principais vias de exposição são a inalação e a ingestão<sup>156,161</sup>.

Ao analisarmos os WB 1D individualmente podemos observar que na região de 37 kDa em que identificamos FBA e GAPDH não é possível enxergar uma reatividade IgE na mesma proporção que com a rFBA neste experimento, o que pode ter ocorrido devido a pouca abundância dessas proteínas geradas *in vitro* em relação ao extrato total.

Ao analisarmos individualmente podemos aferir por massa molecular que entre as proteínas identificadas por 2D SDS-PAGE, seis indivíduos (1, 4, 6, 7, 8 e 9) reconheceram uma proteína na região de 100 kDa, que pode ser a AGP, cinco indivíduos (1, 7, 8, 9 e 10) reconheceram uma proteína na região de 74 kDa, que pode ser a *peptidase\_S9* e na região entre 55 e 60 kDa quatro indivíduos (7, 8, 9, e 10) reconheceram o que pode ser a *cytosol\_AP* e a *ATP synthase*

De todas essas proteínas identificadas três foram escolhidas para realização de proteína recombinante: FBA e GAPDH, por já terem sido encontradas em estudo anterior relacionado a alergia a mandioca e AGP, por ser a proteína que mais apresentou reatividade IgE no WB 1D. Os respectivos plasmídeos foram produzidos, porém só foi possível expressar a proteína FBA em quantidades significativas.

Nos últimos ano, formas recombinantes dos alérgenos mais importantes foram produzidas e se mostraram bastante eficientes, devido à sua alta taxa de pureza, quando comparadas a extratos naturais, em que as concentrações de proteínas são variadas<sup>162</sup>. Para a clínica, o uso de alérgenos recombinantes poderia ser muito eficaz quando utilizado no teste cutâneo, pois permitiria identificar a qual componente específico o indivíduo está sensibilizado, orientando qual dessensibilização deve ser realizada e removendo o risco de expor o indivíduo a novas sensibilizações. Moléculas para diagnóstico *in vitro* vem sendo usadas há vários anos, entretanto não existe disponibilidade para testes cutâneos ou para tratamento por imunoterapia. Na imunoterapia sublingual para pêsego utilizando um extrato em que foi realizada a quantificação prévia do alérgeno *Pru p 3*, a mesma mostrou-se promissora como uma terapia para a síndrome LTP, pois é capaz de modificar a reatividade clínica dos indivíduos quanto a ingestão da fruta e as respostas imunológicas subjacentes com uma boa tolerância geral<sup>163</sup>. Ainda assim, extratos de fontes naturais são amplamente utilizados e, embora sua padronização seja um problema, são os únicos recursos disponíveis para diagnóstico de alergia em testes cutâneos. Os alérgenos recombinantes ainda não são produzidos e larga escala, mesmo com o avanço em sua caracterização, pois são necessários testes rigorosos que aumentam o custo da fabricação dos mesmos<sup>162,164</sup>.

Neste estudo, a proteína recombinante FBA (rFBA) foi produzida e expressa com sucesso em um sistema celular Expi293F e pode ser classificada como um alérgeno principal em nossa coorte, uma vez que 8/10 pacientes reconheceram a molécula isolada. Considerando os critérios de nomenclatura de alérgenos, o mesmo é considerado *major* quando sua frequência de ligação de IgE é >50%, *minor* quando <50% de ligação a IgE, e quando igual a 50% é denominado intermediário<sup>165</sup>, classificando esse alérgeno em nossa coorte como *major*.

Ao observarmos o processo de digestão gástrica de FBA simulada com pepsina, pudemos observar que é uma proteína com um processo de degradação lento, levando entre 30 minutos e 1 hora para total digestão, o que nos mostra seu potencial de sensibilização primária, podendo ocorrer independentemente do contato prévio com látex. De todos os indivíduos que reconheceram rFBA, dois (3 e 4) são profissionais de saúde alérgicos a látex não possuem sensibilização para *Hev b 5* e *6*, alérgenos mais

frequentes para esse grupo de indivíduos<sup>166</sup>. Metade dos indivíduos apresentam uma forte ligação de IgE para esta proteína.

Em trigo e em mandioca, o FBA possui massa molecular semelhante de 37 e 36 kDa respectivamente<sup>111</sup>, com 87% identidade. Na asma do padeiro, a sensibilização por via inalatória é aumentada<sup>167</sup>, acometendo um grupo muito específico de indivíduos, o que, provavelmente, justifica nossa coorte não ser sensibilizada para trigo. Para a mandioca é mais provável que a sensibilização tenha ocorrido pela ingestão. Curiosamente, todos os indivíduos, exceto um, positivos para rFBA, apresentam sintomas respiratórios. Em nossa coorte, os indivíduos que apresentaram reatividade IgE a rFBA não relataram sintomas alérgicos ao trigo e por isso não foram realizados testes *in vitro* para o mesmo, mas esses ensaios poderiam ser realizados futuramente para avaliar essa sensibilização cruzada.

Sabe-se que a desnaturação ou outras alterações conformacionais e/ou estruturais, como a perda de interações secundárias e/ou terciárias, formando novos rearranjos de pontes dissulfeto, podem ocorrer, tornando os alimentos mais ou menos alergênicos<sup>97,98</sup>. Estudos mostraram que os componentes da matriz alimentar podem não apenas alterar a estrutura das proteínas, mas também alterar os processos biológicos de sensibilização no corpo humano, afetando sua alergenicidade. O processamento causa interações físico-químicas entre os componentes da matriz alimentar e com isso os alérgenos são liberados. Esses processos podem promover a formação de agregados entre eles e a matriz, limitando a destruição do epítipo, mas também podem levar à geração de novos alérgenos por meio de reações químicas entre os alérgenos e os componentes da matriz<sup>168</sup>. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos que podem estar envolvidos neste caso.

A espécie mais próxima de *Manihot esculenta*, que também pertence à ordem *Euphorbiaceae*, é a *Hevea brasiliensis*, cujo proteoma já foi descrito e as proteínas FBA e GAPDH estavam presentes<sup>112</sup>. Em nossa coorte, 70% (7/10) são profissionais de saúde e destes 57% (4/7) também são alérgicos ao látex. Sendo assim, podemos inferir que a sensibilização aos alérgenos na mandioca pode ter ocorrido devido ao contato constante com o pó da luva de látex. Porém, dos oito indivíduos que apresentaram reatividade de IgE com a proteína recombinante FBA, dois não apresentam alergia ao látex. Este é, então, o primeiro relato de um alérgeno da mandioca com características que permitam que seja um agente sensibilizante primário por ingestão oral, visto que

essa proteína resistiu à digestão por pepsina por mais de 30 minutos, embora ensaios com outras coortes sejam necessários para confirmar essa hipótese. Para etapas futuras acreditamos que a produção das moléculas recombinantes homólogas ao *Pers a 1*, *Act d 1*, *Act d 7* e *Mus a 2* seriam alvos interessantes para se testar reatividade cruzada da mandioca com frutas.

## 7 CONCLUSÃO

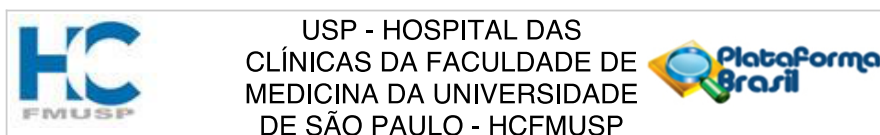
Neste estudo a análise proteômica do extrato total de mandioca, gerou a identificação de 474 proteínas, sendo que 51 apresentam potencial alergênico a partir de análises *in silico*.

Identificamos algumas proteínas reativas a IgE em *Manihot esculenta* que podem estar envolvidas em reatividades cruzadas com outros alimentos. Destas, três ainda não haviam sido descritas como alergênicas até o momento (*alpha-1,4 glucan phosphorylase*, *cytosol\_AP* e *peptidase\_S9*) e outras já foram previamente identificadas em outras fontes (*fructose-biphosphate aldolase*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* e *ATP synthase*), além de proteínas homólogas aos alérgenos já descritos *Pers a 1*, *Act d 1*, *Act d 7* e *Mus a 2*.

Produzimos o alérgeno frutose-bifosfato aldolase na sua forma recombinante, que apresentou estabilidade à digestão por pepsina e reatividade IgE específica contra soros de indivíduos alérgicos apenas à mandioca. A molécula pode ser sensibilizante em outras fontes além da mandioca e pode futuramente ser utilizada em estratégias diagnósticas para testes *in vitro* e *in vivo*, além de terapias alérgeno-específicas em indivíduos alérgicos a *Manihot esculenta*.

## 8 ANEXOS

### ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DA COORDENADORIA DE ÉTICA EM PESQUISA DA FMUSP 30801420.7.0000.690



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Identificação e caracterização dos alérgenos da mandioca.

**Pesquisador:** Keity Souza Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 30801420.7.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

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

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.012.690

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Doutorado da aluna Anne Karoline Rocha Medrado Ventura, que apresenta como objetivo analisar em indivíduos alérgicos a mandioca a reatividade cruzada com frutas diversas. Para o desenvolvimento deste estudo os pesquisadores vão utilizar extratos proteicos de frutas, látex e mandioca extraídos em laboratório; utilizando os soros congelados de pacientes previamente recrutados em projeto anterior. O estudo está bem descrito e apresenta grande relevância na prática clínica.

##### Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores vão identificar e caracterizar em indivíduos alérgicos a mandioca, a reatividade cruzada com frutas diversas. Os objetivos do estudo estão claros e bem justificados e a metodologia descrita está adequada para a conclusão do projeto.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O protocolo não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa.

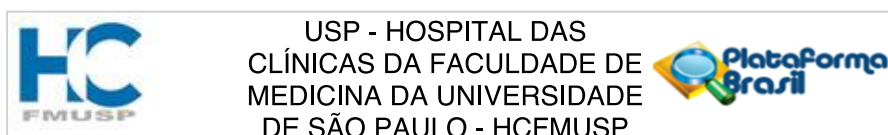
##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os resultados do estudo serão de grande valia para a prática clínica.

##### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Neste estudo os pesquisadores vão utilizar soros de pacientes já coletados em projeto anterior, dispensa TCLE

**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



Continuação do Parecer: 4.012.690

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 07 de Maio de 2020

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
**(Coordenador(a))**

**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

## 9 REFERÊNCIAS

1. Rothenberg ME. Linking the allergy epidemic to climate change. *Nat Immunol.* 02 2022;23(2):149. doi:10.1038/s41590-021-01119-5
2. Haspeslagh E, Heyndrickx I, Hammad H, Lambrecht BN. The hygiene hypothesis: immunological mechanisms of airway tolerance. *Curr Opin Immunol.* 10 2018;54:102-108. doi:10.1016/j.coi.2018.06.007
3. Ogulur I, Pat Y, Ardicli O, et al. Advances and highlights in biomarkers of allergic diseases. *Allergy.* 12 2021;76(12):3659-3686. doi:10.1111/all.15089
4. Stiemsma LT, Turvey SE. Asthma and the microbiome. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2017;13:3. doi:10.1186/s13223-016-0173-6
5. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* Nov 18 1989;299(6710):1259-60. doi:10.1136/bmj.299.6710.1259
6. Marwa K, Kondamudi NP. *Type IV Hypersensitivity Reaction.* StatPearls [Internet]. 2022.
7. Brough HA, Nadeau KC, Sindher SB, et al. Epicutaneous sensitization in the development of food allergy: What is the evidence and how can this be prevented? *Allergy.* 09 2020;75(9):2185-2205. doi:10.1111/all.14304
8. Palomares O, Akdis M, Martín-Fontecha M, Akdis CA. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol Rev.* 07 2017;278(1):219-236. doi:10.1111/imr.12555
9. Abbas, AK LA, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular 7ª edição* ed. Elsevier; 2015.
10. Abbas, AK LA, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular 7ª edição* ed. Elsevier; 2011.
11. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 10 2016;138(4):984-1010. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.033
12. Uzzaman A, Cho SH. Chapter 28: Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc.* 2012 May-Jun 2012;33 Suppl 1:96-99. doi:10.2500/aap.2012.33.3561
13. Janeway P, Murphy, K, Walport, M. *Imunobiologia. Editora Artmed. 8ª edição.*
14. StatPearls. 2022.
15. Ellenbogen Y, Jiménez-Saiz R, Spill P, Chu DK, Wasserman S, Jordana M. The Initiation of Th2 Immunity Towards Food Allergens. *Int J Mol Sci.* May 2018;19(5)doi:10.3390/ijms19051447
16. Kanagaratham C, El Ansari YS, Lewis OL, Oettgen HC. IgE and IgG Antibodies as Regulators of Mast Cell and Basophil Functions in Food Allergy. *Front Immunol.* 2020;11:603050. doi:10.3389/fimmu.2020.603050
17. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* Feb 2010;125(2 Suppl 2):S116-25. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.028
18. Calvani M, Anania C, Caffarelli C, et al. Food allergy: an updated review on pathogenesis, diagnosis, prevention and management. *Acta Biomed.* 09 15 2020;91(11-S):e2020012. doi:10.23750/abm.v91i11-S.10316
19. Sánchez J, Sánchez A. Epidemiology of food allergy in Latin America. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2015 Mar-Apr 2015;43(2):185-95. doi:10.1016/j.aller.2013.07.001



20. U.S Food & Drug Administration - FDA. Food Allergies - 23 de Jun. de 2022. Acesso em: 16 de Ago. de 2022 - Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/food-labeling-nutrition/food-allergies>>. <https://www.fda.gov/food/food-labeling-nutrition/food-allergies>
21. Foo ACY, Mueller GA. Abundance and Stability as Common Properties of Allergens. *Front Allergy*. 2021;2:769728. doi:10.3389/falgy.2021.769728
22. De Martinis M, Sirufo MM, Suppa M, Ginaldi L. New Perspectives in Food Allergy. *Int J Mol Sci*. Feb 2020;21(4)doi:10.3390/ijms21041474
23. 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*. Jun 2016;200:146-53. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.015
24. Mansoor DK, Sharma HP. Clinical presentations of food allergy. *Pediatr Clin North Am*. Apr 2011;58(2):315-26, ix. doi:10.1016/j.pcl.2011.02.008
25. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2013. *J Allergy Clin Immunol*. Feb 2014;133(2):324-34. doi:10.1016/j.jaci.2013.11.013
26. Renz H, Allen, K., Sicherer, S. *et al.* Food allergy. Nature Reviews Disease Primers doi:<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.98>
27. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 01 2018;141(1):41-58. doi:10.1016/j.jaci.2017.11.003
28. Anvari S, Miller J, Yeh CY, Davis CM. IgE-Mediated Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol*. Oct 2019;57(2):244-260. doi:10.1007/s12016-018-8710-3
29. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 12 2016;16(12):751-765. doi:10.1038/nri.2016.111
30. Xiong Y, Xu G, Chen M, Ma H. Intestinal Uptake and Tolerance to Food Antigens. *Front Immunol*. 2022;13:906122. doi:10.3389/fimmu.2022.906122
31. Bauer RN, Manohar M, Singh AM, Jay DC, Nadeau KC. The future of biologics: applications for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. Feb 2015;135(2):312-23. doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1908
32. Solé D, Silva LR, Filho NAR, Sarni ROS. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2007. *Rev Méd Minas Gerais*. 18 (1 Supl 1): S1-S44, 2008; 2008.
33. Cianferoni A. Non-IgE Mediated Food Allergy. *Curr Pediatr Rev*. 2020;16(2):95-105. doi:10.2174/1573396315666191031103714
34. Connors L, O'Keefe A, Rosenfield L, Kim H. Non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;14(Suppl 2):56. doi:10.1186/s13223-018-0285-2
35. Nowak-Węgrzyn A, Katz Y, Mehr SS, Koletzko S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. May 2015;135(5):1114-24. doi:10.1016/j.jaci.2015.03.025
36. Maggadottir SM, Hill DA, Ruymann K, et al. Resolution of acute IgE-mediated allergy with development of eosinophilic esophagitis triggered by the same food. *J Allergy Clin Immunol*. May 2014;133(5):1487-9, 1489.e1. doi:10.1016/j.jaci.2014.02.004
37. van Rhijn BD, Vlieg-Boerstra BJ, Versteeg SA, et al. Evaluation of allergen-microarray-guided dietary intervention as treatment of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. Oct 2015;136(4):1095-7.e3. doi:10.1016/j.jaci.2015.02.038

38. Muluk NB, Cingi C. Oral allergy syndrome. *Am J Rhinol Allergy*. Jan 2018;32(1):27-30. doi:10.2500/ajra.2018.32.4489
39. Yu W, Freeland DM, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 12 2016;16(12):751-765. doi:10.1038/nri.2016.111
40. Hilvo M. Maternal Elimination Diet and Symptoms of Cow's Milk Allergy in Breastfed Infants. *JAMA Pediatr*. 04 01 2021;175(4):425-426. doi:10.1001/jamapediatrics.2020.5311
41. Hossny E, Ebisawa M, El-Gamal Y, et al. Challenges of managing food allergy in the developing world. *World Allergy Organ J*. Nov 2019;12(11):100089. doi:10.1016/j.waojou.2019.100089
42. Sampath V, Abrams EM, Adlou B, et al. Food allergy across the globe. *J Allergy Clin Immunol*. 12 2021;148(6):1347-1364. doi:10.1016/j.jaci.2021.10.018
43. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol*. Dec 2010;126(6 Suppl):S1-58. doi:10.1016/j.jaci.2010.10.007
44. Taylor SL, Hefle SL. Food allergen labeling in the USA and Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. Jun 2006;6(3):186-90. doi:10.1097/01.all.0000225158.75521.ad
45. Fleischer DM, Chan ES, Venter C, et al. A Consensus Approach to the Primary Prevention of Food Allergy Through Nutrition: Guidance from the American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology; American College of Allergy, Asthma, and Immunology; and the Canadian Society for Allergy and Clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 01 2021;9(1):22-43.e4. doi:10.1016/j.jaip.2020.11.002
46. Krawiec M, Fisher HR, Du Toit G, Bahnson HT, Lack G. Overview of oral tolerance induction for prevention of food allergy-Where are we now? *Allergy*. 09 2021;76(9):2684-2698. doi:10.1111/all.14758
47. Allen JW, Edwards N, Koplin JJ, Netting MJ, Allen KJ. International compliance with WHO infant feeding guidelines - Is the confusion cause for concern? *Allergy*. 03 2020;75(3):673-674. doi:10.1111/all.13979
48. Panjari M, Koplin JJ, Dharmage SC, et al. Nut allergy prevalence and differences between Asian-born children and Australian-born children of Asian descent: a state-wide survey of children at primary school entry in Victoria, Australia. *Clin Exp Allergy*. Apr 2016;46(4):602-9. doi:10.1111/cea.12699
49. Silva LA, Silva AF, Ribeiro Â, Silva AO, Vieira FA, Segundo GR. Adult Food Allergy Prevalence: Reducing Questionnaire Bias. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;171(3-4):261-264. doi:10.1159/000453036
50. Rosario-Filho NA, Jacob CM, Sole D, et al. Pediatric allergy and immunology in Brazil. *Pediatr Allergy Immunol*. Jun 2013;24(4):402-9. doi:10.1111/pai.12069
51. Rouquayrol MZ, Filho NA. *Epidemiologia & Saúde*. Rio de Janeiro: Medbook.; 2018.
52. Niggemann B, Beyer K. Pitfalls in double-blind, placebo-controlled oral food challenges. *Allergy*. Jul 2007;62(7):729-32. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01396.x
53. Kobernick AK, Burks AW. Active treatment for food allergy. *Allergology International*. 65(4):388-395. doi:10.1016/j.alit.2016.08.002
54. Ansoategui IJ, Melioli G, Canonica GW, et al. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J*. Feb 2020;13(2):100080. doi:10.1016/j.waojou.2019.100080
55. Pawankar, R, Canonica GW, Holgate ST, RF L. *WAO*

*White Book on Allergy*. World Allergy Organization; 2011.

56. Barni S, Liccioli G, Sarti L, Giovannini M, Novembre E, Mori F. Immunoglobulin E (IgE)-Mediated Food Allergy in Children: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Management. *Medicina (Kaunas)*. Mar 04 2020;56(3)doi:10.3390/medicina56030111
57. MOURA KSV. A RAIZ DA MANDIOCA ENQUANTO ELEMENTO CULTURAL DA CULINARIA NA COMUNIDADE QUILOMBOLA LAGOA DA PEDRA. Monografia. Tocantins. 2020:73.
58. Leonel LTDeM. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FARINHAS DE MANDIOCA DE DIFERENTES LOCALIDADES DO BRASIL. *Ciênc agrotec, Lavras*. 2006;v. 30, n. 4, p.:p. 692-700.
59. Antolin-Amerigo D, Rodriguez-Rodriguez M, Barbarroja-Escudero J, Postigo Resa I, Uribe-Etxebarria MC, Alvarez-Mon M. Hypersensitivity to cassava: an allergen-based assessment. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(5):385-6.
60. Zhu F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. *Carbohydr Polym*. May 2015;122:456-80. doi:10.1016/j.carbpol.2014.10.063
61. Sheffield J, Taylor N, Fauquet C, Chen S. The cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root proteome: protein identification and differential expression. *Proteomics*. Mar 2006;6(5):1588-98. doi:10.1002/pmic.200500503
62. Li K, Zhu W, Zeng K, et al. Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. *Proteome Sci*. Feb 2010;8:10. doi:10.1186/1477-5956-8-10
63. Rivadeneyra-Domínguez E, Rodríguez-Landa JF. Preclinical and clinical research on the toxic and neurological effects of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) consumption. *Metab Brain Dis*. 01 2020;35(1):65-74. doi:10.1007/s11011-019-00522-0
64. AGRICULTURE FA, ORGANIZATION. EFFECT OF CASSAVA PRODUCTION ON BIODIVERSITY. <http://www.fao.org/3/y2413e/y2413e0c.htm>
65. Cohen KdO, Oliveira SS, Chisté RC. Quantificação de Teores de Compostos Cianogênicos Totais em Produtos Elaborados com Raízes de Mandioca. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA; 2007.
66. Gaspar A, Neto-Braga C, Pires G, Murta R, Moraes-Almeida M, Rosado-Pinto J. Anaphylactic reaction to manioc: cross-reactivity to latex. *Allergy*. Jul 2003;58(7):683-4. doi:10.1034/j.1398-9995.2003.00184.x
67. C.E.S. Galvao LKI, M.E.B. Andrade , J. Kalil , F.F.Morato Castro. Latex allergy and cross-reactivity to manioc : Report of 2 cases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*2004. p. S61.
68. Ibero M, Castillo MJ, Pineda F. Allergy to cassava: a new allergenic food with cross-reactivity to latex. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(6):409-12.
69. Santos KS, Gadermaier G, Vejvar E, et al. Novel allergens from ancient foods: Man e 5 from manioc (*Manihot esculenta* Crantz) cross reacts with Hev b 5 from latex. *Mol Nutr Food Res*. Jun 2013;57(6):1100-9. doi:10.1002/mnfr.201200433
70. Santos KS, Galvao CE, Gadermaier G, et al. Allergic reactions to manioc (*Manihot esculenta* Crantz): identification of novel allergens with potential involvement

- in latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. Dec 2011;128(6):1367-9. doi:10.1016/j.jaci.2011.07.019
71. Brito RRdeV, Thiago Almeida. Exploração econômica do látex da *Hevea brasiliensis* no desenvolvimento da região Norte do Brasil. *Nature and Conservation*: n. 1; 2018.
72. Costa RB, Gonçalves PS, Odalia-Rímolía A, Arruda EJ. Melhoramento e conservação genética aplicados ao desenvolvimento local: o caso da seringueira (*Hevea sp*). *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*; 2001. p. p.51-58.
73. Berthelot K, Peruch F, Lecomte S. Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro)hevein proteins. *Biochimie*. Aug 2016;127:258-70. doi:10.1016/j.biochi.2016.06.006
74. Wu M, McIntosh J, Liu J. Current prevalence rate of latex allergy: Why it remains a problem? *J Occup Health*. May 2016;58(2):138-44. doi:10.1539/joh.15-0275-RA
75. Vandenplas O, Raulf M. Occupational Latex Allergy: the Current State of Affairs. *Curr Allergy Asthma Rep*. Mar 2017;17(3):14. doi:10.1007/s11882-017-0682-5
76. StatPearls. 2019.
77. Gawchik SM. Latex Allergy. *Mont Sinai Journal of Medicine*; 2011.
78. Popescu FD. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol*. Jun 2015;5(2):31-50. doi:10.5662/wjm.v5.i2.31
79. Rodriguez J, Crespo JF, Lopez-Rubio A, et al. Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family. *J Allergy Clin Immunol*. Jul 2000;106(1 Pt 1):183-9. doi:10.1067/mai.2000.106927
80. Bastiaan-Net S, Reitsma M, Cordewener JHG, et al. IgE Cross-Reactivity of Cashew Nut Allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019 2019;178(1):19-32. doi:10.1159/000493100
81. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Current understanding of food allergens. *Ann N Y Acad Sci*. May 2002;964:69-85.
82. Aalberse RC. Assessment of allergen cross-reactivity. *Clin Mol Allergy*. Feb 2007;5:2. doi:10.1186/1476-7961-5-2
83. Genov I, al. e. Tropomiosinas e reatividade cruzada. *Rev bras alerg imunopatol* 2009.
84. Carrapatoso I. Cross-reactivity between foods of the same groups: review article. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*; 2004.
85. Kütting B, Brehler R. [House dust mite-crustaceans-molluscs syndrome. A rare variant of food allergy in primary sensitization to inhaled allergens]. *Hautarzt*. Aug 2001;52(8):708-11. doi:10.1007/s001050170086
86. Cudowska B, Kaczmarek M, Wasilewska J. Cross allergic reactions in infants and toddlers with atopic dermatitis. *Adv Med Sci*. 2013;58(2):401-7. doi:10.2478/ams-2013-0022
87. Lee MF, Chen YH, Lan JL, Tseng CY, Wu CH. Allergenic components of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) show IgE cross-reactivity with latex allergen. *Int Arch Allergy Immunol*. Mar 2004;133(3):211-6. doi:10.1159/000076826
88. Ownby DR. A history of latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*. Aug 2002;110(2 Suppl):S27-32. doi:10.1067/mai.2002.125336
89. Adriano Bueno de Sá MCM, Dirceu Solé. Alergia ao látex: atualização. *Rev. bras. alerg. imunopatol.*; 2010.
90. Gaspar Aea. Prevalência e factores de risco para síndrome látex frutos em doentes com alergia ao látex *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*; 2004.

91. Kelly KJ, Sussman G. Latex Allergy: Where Are We Now and How Did We Get There? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017 Sep - Oct 2017;5(5):1212-1216. doi:10.1016/j.jaip.2017.05.029
92. Solé D, al. e. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2018 - Parte 1 - Etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. *Asma, Alergia e Imunologia: ASBAI - Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia*; 2018.
93. Faber MA, Van Gasse AL, Decuyper II, et al. Cross-Reactive Aeroallergens: Which Need to Cross Our Mind in Food Allergy Diagnosis? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018 Nov - Dec 2018;6(6):1813-1823. doi:10.1016/j.jaip.2018.08.010
94. García BE, Lizaso MT. Cross-reactivity syndromes in food allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2011;21(3):162-70; quiz 2 p following 170.
95. Merwat SN, Spechler SJ. Might the use of acid-suppressive medications predispose to the development of eosinophilic esophagitis? *Am J Gastroenterol.* Aug 2009;104(8):1897-902. doi:10.1038/ajg.2009.87
96. Yang H, Yang A, Santos K, C. Galvão and F. Castro. "The Assessment of the Arising of Food Allergy among Antiacid Users Using Mathematical Model," *Applied Mathematics* , Vol. 3 No. 3, 2012, pp. 293-307. doi: 10.4236/am.2012.33045 .
97. Davis PJ, Williams SC. Protein modification by thermal processing. *Allergy.* 1998;53(46 Suppl):102-5.
98. 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. Article ID 254152: *BioMed Research International*; 2015. p. 6.
99. 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.* Jul 2005;5(10):2497-507. doi:10.1002/pmic.200401222
100. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc.* Jan 2016;11(1):102-17. doi:10.1038/nprot.2015.133
101. 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.* Sep 1979;76(9):4350-4.
102. 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.
103. Expi293™  
Expression System: Structural  
Biology and Inducible Expression Modules  
USER GUIDE. 2020.
104. ThermoFisher Scientific; Expi293™ Expression System: Structural Biology and Inducible Expression Modules USER GUIDE. 2020.
105. Lima EMS, Lima ICdS, Coelho CDP, Lima MCdS. Uma visão diferenciada no manejo do dermatografismo. *AAAI - Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia.* 2015;3(3)doi:10.5935/2318-5015.20150017

106. Giangrieco I, Ricciardi T, Alessandri C, et al. ENEA, a peach and apricot IgE-binding protein cross-reacting with the latex major allergen Hev b 5. *Mol Immunol*. 08 2019;112:347-357. doi:10.1016/j.molimm.2019.05.007
107. Kurien, Biji T.; Scofield, R. Hal (2019). [Methods in Molecular Biology] *Electrophoretic Separation of Proteins Volume 1855 (Methods and Protocols) // Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE.* , 10.1007/978-1-4939-8793-1(Chapter 10), 101–105. doi:10.1007/978-1-4939-8793-1\_10
108. Chuang JG, Su SN, Chiang BL, Lee HJ, Chow LP. Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the German cockroach (*Blattella germanica*) and allergen profiling of patients. *Proteomics*. Nov 2010;10(21):3854-67. doi:10.1002/pmic.201000348
109. Gamboa PM, Bartolomé B, García Lirio E, Cuesta-Herranz J, Pastor-Vargas C. Aldolase: A new Crustacea allergen. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 08 2018;121(2):246-247. doi:10.1016/j.anai.2018.04.025
110. Kuehn A, Hilger C, Lehnert-Weber C, et al. Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens. *Clin Exp Allergy*. Jul 2013;43(7):811-22. doi:10.1111/cea.12117
111. Baur X, Posch A. Characterized allergens causing bakers' asthma. *Allergy*. Jun 1998;53(6):562-6. doi:10.1111/j.1398-9995.1998.tb03931.x
112. D'Amato A, Bachi A, Fasoli E, et al. In-depth exploration of Hevea brasiliensis latex proteome and "hidden allergens" via combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteomics*. May 07 2010;73(7):1368-80. doi:10.1016/j.jprot.2010.03.002
113. Rost J, Muralidharan S, Lee NA. A label-free shotgun proteomics analysis of macadamia nut. *Food Res Int*. 03 2020;129:108838. doi:10.1016/j.foodres.2019.108838
114. Gadermaier G, Eichhorn S, Vejvar E, et al. *Plantago lanceolata*: an important trigger of summer pollinosis with limited IgE cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol*. Aug 2014;134(2):472-5. doi:10.1016/j.jaci.2014.02.016
115. Nayak AP, Green BJ, Sussman G, et al. Characterization of *Cannabis sativa* allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol*. Jul 2013;111(1):32-7. doi:10.1016/j.anai.2013.04.018
116. Huerta-Ocampo J, Valenzuela-Corral A, Robles-Burgueño MDR, et al. Proteomic identification of allergenic proteins in red oak (*World Allergy Organ J*. Mar 2020;13(3):100111. doi:10.1016/j.waojou.2020.100111
117. Raulf M. Allergen component analysis as a tool in the diagnosis and management of occupational allergy. *Mol Immunol*. 08 2018;100:21-27. doi:10.1016/j.molimm.2018.03.013
118. Yagami T, Haishima Y, Tsuchiya T, Tomitaka-Yagami A, Kano H, Matsunaga K. Proteomic analysis of putative latex allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. Sep 2004;135(1):3-11. doi:10.1159/000080036
119. Weichel M, Vergoossen NJ, Bonomi S, et al. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy*. Jan 2006;61(1):128-35. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.00999.x
120. Sánchez-Monge R, García-Casado G, López-Otín C, Armentia A, Salcedo G. Wheat flour peroxidase is a prominent allergen associated with baker's asthma. *Clin Exp Allergy*. Oct 1997;27(10):1130-7.

121. Matsuo H, Uemura M, Yorozuya M, Adachi A, Morita E. Identification of IgE-reactive proteins in patients with wheat protein contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. Jul 2010;63(1):23-30. doi:10.1111/j.1600-0536.2010.01741.x
122. Oldenburg M, Petersen A, Baur X. Maize pollen is an important allergen in occupationally exposed workers. *J Occup Med Toxicol*. Dec 13 2011;6:32. doi:10.1186/1745-6673-6-32
123. Fonseca C, Planchon S, Renaut J, Oliveira MM, Batista R. Characterization of maize allergens - MON810 vs. its non-transgenic counterpart. *J Proteomics*. Apr 03 2012;75(7):2027-37. doi:10.1016/j.jprot.2012.01.005
124. Fasoli E, Pastorello EA, Farioli L, et al. Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools. *J Proteomics*. Apr 13 2009;72(3):501-10. doi:10.1016/j.jprot.2009.01.013
125. Singh B, Oellerich M, Kumar R, et al. Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*. *J Proteome Res*. Nov 05 2010;9(11):5517-29. doi:10.1021/pr100604x
126. Kurup VP, Shen HD, Vijay H. Immunobiology of fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. Nov 2002;129(3):181-8. doi:10.1159/000066780
127. Miller JD. The Role of Dust Mites in Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol*. Dec 2019;57(3):312-329. doi:10.1007/s12016-018-8693-0
128. Nguyen K, Kohli A. StatPearls. *Latex Allergy*. 2022.
129. Wang D, Sun Y, Chang L, et al. Subcellular proteome profiles of different latex fractions revealed washed solutions from rubber particles contain crucial enzymes for natural rubber biosynthesis. *J Proteomics*. 06 30 2018;182:53-64. doi:10.1016/j.jprot.2018.05.002
130. Levorato CD, Mello, L. M. de ., Silva, A. S. da ., & Nunes, A. A.. (2014). Fatores associados à procura por serviços de saúde numa perspectiva relacional de gênero. *Ciência & Saúde Coletiva* , 19 (Ciênc. saúde coletiva, 2014 19(4)). <https://doi.org/10.1590/1413-81232014194.01242013>.
131. Matos I, Toassi RaO, M. (2013). Health Professions and Occupations and Feminization Process: Trends and Implications. Athenea Digital. Revista de pensamiento e investigación social. 13. 239. 10.5565/rev/athenead/v13n2.1119.
132. Koper I, Hufnagl K, Ehmann R. Gender aspects and influence of hormones on bronchial asthma - Secondary publication and update. *World Allergy Organ J*. 2017;10(1):46. doi:10.1186/s40413-017-0177-9
133. Afify SM, Pali-Schöll I. Adverse reactions to food: the female dominance - A secondary publication and update. *World Allergy Organ J*. 2017;10(1):43. doi:10.1186/s40413-017-0174-z
134. Jensen-Jarolim E. Gender effects in allergology - Secondary publications and update. *World Allergy Organ J*. 2017;10(1):47. doi:10.1186/s40413-017-0178-8
135. Rojas-Mandujano V, González-Juárez K, Hernández-Fernández C, O'Farrill-Romanillos PM, Del Rivero L, Herrera-Sánchez DA. [Latex-papaya syndrome: an infrequent association]. *Rev Alerg Mex*. 2018 Jan-Mar 2018;65(1):3-9. doi:10.29262/ram.v65i1.302
136. Grzywnowicz M, Majsiak E, Gawel J, Miśkiewicz K, Doniec Z, Kurzawa R. Inhibition of Cross-Reactive Carbohydrate Determinants in Allergy Diagnostics. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1116:75-79. doi:10.1007/5584\_2018\_266
137. Macaubas C, Sly PD, Burton P, et al. Regulation of T-helper cell responses to inhalant allergen during early childhood. *Clin Exp Allergy*. Sep 1999;29(9):1223-31. doi:10.1046/j.1365-2222.1999.00654.x

138. Cabanillas B, Rodríguez J, Blanca N, Jiménez MA, Crespo JF. Clinically relevant cross-reactivity between latex and passion fruit. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Nov 2009;103(5):449. doi:10.1016/S1081-1206(10)60370-5
139. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol.* Feb 2003;111(2):350-9. doi:10.1067/mai.2003.35
140. Lavaud F, Prevost A, Cossart C, Guerin L, Bernard J, Kochman S. Allergy to latex, avocado pear, and banana: evidence for a 30 kd antigen in immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol.* Feb 1995;95(2):557-64. doi:10.1016/s0091-6749(95)70318-7
141. Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, et al. Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans. *J Allergy Clin Immunol.* Sep 1999;104(3 Pt 1):681-7. doi:10.1016/s0091-6749(99)70342-8
142. Sarkar MB, Sircar G, Ghosh N, et al. Cari p 1, a Novel Polygalacturonase Allergen From Papaya Acting as Respiratory and Food Sensitizer. *Front Plant Sci.* 2018;9:823. doi:10.3389/fpls.2018.00823
143. Bhowmik M, Biswas Sarkar M, Kanti Sarkar R, et al. Cloning and immunobiochemical analyses on recombinant chymopapain allergen Cari p 2 showing pollen-fruit cross-reaction. *Mol Immunol.* 09 2021;137:42-51. doi:10.1016/j.molimm.2021.06.010
144. Sanchez-Monge R, Blanco C, Díaz-Perales A, et al. Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases. *Clin Exp Allergy.* May 1999;29(5):673-80. doi:10.1046/j.1365-2222.1999.00526.x
145. Sowka S, Hsieh LS, Krebitz M, et al. Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem.* Oct 23 1998;273(43):28091-7. doi:10.1074/jbc.273.43.28091
146. Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, et al. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol.* Apr 1998;101(4 Pt 1):531-7. doi:10.1016/S0091-6749(98)70360-4
147. Palazzo P, Tuppo L, Giangrieco I, et al. Prevalence and peculiarities of IgE reactivity to kiwifruit pectin methylesterase and its inhibitor, Act d 7 and Act d 6, in subjects allergic to kiwifruit. *Food Research International*; 2013. p. 24-30.
148. Chin CF, Teoh EY, Chee MJY, Al-Obaidi JR, Rahmad N, Lawson T. Comparative Proteomic Analysis on Fruit Ripening Processes in Two Varieties of Tropical Mango (*Mangifera indica*). *Protein J.* 12 2019;38(6):704-715. doi:10.1007/s10930-019-09868-x
149. Mainardi JA, Purgatto E, Vieira A, et al. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of alpha-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *J Agric Food Chem.* Sep 20 2006;54(19):7294-9. doi:10.1021/jf061180k
150. UniProt - UniProtKB, Protein knowledgebase. - Available in: <<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A251IQB4/entry>>.
151. UniProt - UniProtKB, Protein knowledgebase. - Available in: <<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A2C9VPN2/entry>>.
152. Paschke A, Kinder H, Zunker K, et al. Characterization of cross-reacting allergens in mango fruit. *Allergy.* Mar 2001;56(3):237-42. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.056003237.x
153. Ruethers T, Taki AC, Karnaneedi S, et al. Expanding the allergen repertoire of salmon and catfish. *Allergy.* 05 2021;76(5):1443-1453. doi:10.1111/all.14574



154. Xu ZQ, Zhu LX, Lu C, et al. Identification of Per a 13 as a novel allergen in American cockroach. *Mol Immunol*. 03 2022;143:41-49. doi:10.1016/j.molimm.2022.01.004
155. Palacin A, Quirce S, Armentia A, et al. Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol*. Nov 2007;120(5):1132-8. doi:10.1016/j.jaci.2007.07.008
156. Kamath SD, Rahman AM, Voskamp A, et al. Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach. *Mol Nutr Food Res*. May 2014;58(5):1144-55. doi:10.1002/mnfr.201300584
157. Akimoto S, Yokooji T, Ogino R, et al. Identification of allergens for food-dependent exercise-induced anaphylaxis to shrimp. *Sci Rep*. 03 08 2021;11(1):5400. doi:10.1038/s41598-021-84752-2
158. Tonomura K, Fujimoto R, Okuda Y, et al. [A CASE OF FOOD-DEPENDENT EXERCISE-INDUCED ANAPHYLAXIS BY SHRIMP: FRUCTOSE 1, 6-BISPHOSPHATE ALDOLASE IS SUPPOSED AS CAUSATIVE COMPONENT DESPITE NEGATIVE ALLERGEN-SPECIFIC IGE TEST (IMMUNOCAP. *Arerugi*. 2019 2019;68(1):48-53. doi:10.15036/arerugi.68.48
159. Sookrung N, Wong-din-Dam S, Tungtrongchitr A, et al. Proteome and allergenome of Asian wasp, *Vespa affinis*, venom and IgE reactivity of the venom components. *J Proteome Res*. Mar 07 2014;13(3):1336-44. doi:10.1021/pr4009139
160. Ji-Rui Wang Y-MW, George Fedak , Zhi-Gang Liu , Qian-Tao Jiang , Zhi-En Pu , You-Liang Zheng. Molecular Characterization of Major Allergens Associated with Baker's Asthma in Wheat Flour. *Food Science and Technology Research*. 2010;16(4).
161. Lv GY, Guo XG, Xie LP, et al. Molecular Characterization, Gene Evolution, and Expression Analysis of the Fructose-1, 6-bisphosphate Aldolase (FBA) Gene Family in Wheat (*Front Plant Sci*. 2017;8:1030. doi:10.3389/fpls.2017.01030
162. Niederberger V, Eckl-Dorna J, Pauli G. Recombinant allergen-based provocation testing. *Methods*. Mar 01 2014;66(1):96-105. doi:10.1016/j.ymeth.2013.07.037
163. Fernández-Rivas M, Garrido Fernández S, Nadal JA, et al. Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy*. Jun 2009;64(6):876-83. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01921.x
164. Valenta R, Karaulov A, Niederberger V, et al. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018 Nov - Dec 2018;6(6):1845-1855.e2. doi:10.1016/j.jaip.2018.08.032
165. Caraballo L, Valenta R, Acevedo N, Zakzuk J. Are the Terms Major and Minor Allergens Useful for Precision Allergology? *Front Immunol*. 2021;12:651500. doi:10.3389/fimmu.2021.651500
166. Nowakowska-Świrta E, Wiszniewska M, Walusiak-Skorupa J. Allergen-specific IgE to recombinant latex allergens in occupational allergy diagnostics. *J Occup Health*. Sep 2019;61(5):378-386. doi:10.1002/1348-9585.12064
167. Jeebhay MF, Baatjies R. Prevention of baker's asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 04 2020;20(2):96-102. doi:10.1097/ACI.0000000000000612
168. Liu Q, Lin S, Sun N. How does food matrix components affect food allergies, food allergens and the detection of food allergens? A systematic review. *Trends in Food Science & Technology* 2022 p. 280-290.