

SAFIRI DE PAIVA ALVES

**Avaliação da resposta imune celular em indivíduos alérgicos a
mandioca com o alérgeno recombinante Man e 5**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Keity Souza Santos

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

São Paulo

2023

SAFIRI DE PAIVA ALVES

**Avaliação da resposta imune celular em indivíduos alérgicos a
mandioca com o alérgeno recombinante Man e 5**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Keity Souza Santos

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

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alves, Safiri de Paiva

Avaliação da resposta imune celular em indivíduos
alérgicos a mandioca com o alérgeno recombinante
Man e 5 / Safiri de Paiva Alves. -- São Paulo, 2023.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Keity Souza Santos.

Descritores: 1.Hipersensibilidade alimentar
2.Manihot 3.Alérgenos 4.Proteínas recombinantes
5.Linfócitos T 6.Interferon-gama

USP/FM/DBD-468/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Maria e José, por todo apoio em minha carreira acadêmica e por sempre se preocuparem com minha educação. Ao meu marido, Juliano, por sua compreensão, carinho, presença, incentivo, amor e incansável apoio em todos os momentos. Às minhas gatas, por serem meu poço de sanidade mental sempre que necessário.

À Anne Ventura, Ariane Lima, Daniele Danella, Jamille Oliveira e Jhosiene Magawa, por todas as risadas e discussões, por toda ajuda diariamente e por serem o melhor e mais caótico grupo de pesquisa. À Giuliana Medeiros, Luri Sasahara e Amanda Melato, por todas as vezes que precisei de auxílio, de algum docinho ou só para conversar e passar o tempo entre as incubações.

À minha orientadora, Profa. Dra. Keity Santos, por toda paciência e anos de trabalho. Ao Dr. Rafael Ribeiro, por me adotar como sua aluna e ser meu co-orientador não oficial, pela paciência e ensinamentos.

Ao LIM-19 e todos seus colaboradores, especialmente Ana Moretti, Andréia Kuramoto, Samar Freschi, César Remuzgo e Washington da Silva, por sempre me ajudarem no que fosse preciso e pela paciência de conviver com “as meninas da Keity”.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo indispensável apoio financeiro.

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

Sem vocês esse trabalho não seria possível.

“I’m still a believer but I don’t know why,

I’ve never been a natural

All I do is try, try, try.”

Mirrorball – Taylor Swift

(Folklore – 2020)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Alergia	1
1.2. Fisiopatologia da alergia	2
1.3. Alergia alimentar	5
1.3.1. Epidemiologia.....	7
1.3.2. Diagnóstico e tratamento	9
1.4. Alergia à mandioca	10
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MÉTODOS	15
4.1. Seleção de indivíduos	15
4.2. Plasmídeo para expressão da proteína Man e 5 recombinante (rMan e 5)	16
4.3. Transformação de bactérias TOP10 <i>E. coli</i> por choque térmico	16
4.4. Extração e purificação do DNA plasmidial	16
4.5. Quantificação e avaliação do plasmídeo purificado	17
4.6. Expressão da rMan e 5 em células Expi293F	18
4.7. Purificação da rMan e 5 em coluna de cromatografia por afinidade a metais.	18
4.8. Eletroforese 1D e Western blotting com a proteína rMan e 5	19
4.9. Marcação intracelular de citocinas.....	20
4.10. Cultura celular com rMan e 5	21
4.11. PCR em tempo real	21
4.12. ELISA para detecção de citocinas do sobrenadante	22
4.13. Análise estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Produção da proteína rMan e 5	24
5.1.1. Análise do plasmídeo codificador de Man e 5	24
5.1.2. Análise da reatividade IgE com a proteína rMan e 5	26

5.2. Análise da resposta celular do grupo alérgico a mandioca após estímulo inespecífico e na presença da proteína rMan e 5	27
5.2.1. Marcação intracelular de citocinas	27
5.2.2. Detecção de IFN- γ por ELISA	27
5.2.3. Expressão gênica de IFN- γ , IL-10 e IL-13	31
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	36
8. ANEXOS	37
9. REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
γ	Gama
1D	Primeira Dimensão
AA	Alergia Alimentar
ADCC	Citotoxicidade Mediada por Células Dependentes de Anticorpos
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCB	<i>Colloidal Coomassie Blue</i>
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
DC	Célula Dendrítica
DTT	Ditioltreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FBA	Frutose-Bifosfato Aldolase
FcεRI	Receptor de Alta Afinidade para IgE
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPE	Enteropatia Induzida por Proteína Alimentar
FPIAP	Protocolite Induzida por Proteína Alimentar
FPIES	Síndrome de Enterocolite Induzida por Proteína Alimentar
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido Clorídrico
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN	Interferon

Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILC2	Células Linfoides Inatas do Tipo 2
IMAC	Cromatografia por Afinidade a Metais
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodalton
M	Molar
m/v	Massa/Volume
mA	Miliampère
mg	Miligrama
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
OIT	Imunoterapia Oral
pb	Pares de Base
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial de Hidrogênio
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
qPCR	PCR em Tempo Real
rMan e 5	Man e 5 recombinante
SCIT	Imunoterapia Subcutânea
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SLIT	Imunoterapia Sublingual
TA	Temperatura Ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
Tfh	Células T Auxiliares Foliculares
Th1	Células T Auxiliares Do Tipo 1

Th2	Células T Auxiliares Do Tipo 2
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPO	Teste de Provocação Oral
Treg	Células T Regulatórias
TSLP	Linfopietina Estromal Tímica
IUIS	União Internacional das Sociedades Imunológicas
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular-1
v/v	Volume/Volume
WB	Western Blotting

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da fase de sensibilização e efetora da alergia	3
Figura 2. Construção do plasmídeo produtor da proteína Man e 5	24
Figura 3. Análise do gene Man e 5 clonado no vetor de expressão pcDNA3.1	25
Figura 4. Eletroforese SDS-PAGE e Western Blotting com a proteína Man e 5 recombinante	26
Figura 5. Frequência de células T CD4+ produtoras de IFN- γ e IL-13 após estímulo inespecífico com PMA e ionomicina.....	27
Figura 6. Detecção de IFN- γ em sobrenadante de células após estímulo com PMA e ionomicina	28
Figura 7. Análise da produção de IFN- γ em sobrenadante de células após estímulo com Man e 5 recombinante em diferentes concentrações	29
Figura 8. Análise da produção de IFN- γ em diferentes tempos de cultura	29
Figura 9. Comparação da produção de IFN- γ entre grupo alérgico e grupo controle ...	30
Figura 10. Expressão gênica de citocina do perfil Th1 (IFN- γ) e citocinas do perfil Th2 (IL-10 e IL-13).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos indivíduos alérgicos à mandioca	15
Tabela 2. Dados demográficos dos indivíduos do grupo controle sem alergia alimentar	16
Tabela 3. Sequência dos primers desenhados para avaliação da expressão de genes imunológicos	47

Alves SP. Avaliação da resposta imune celular em indivíduos alérgicos a mandioca com o alérgeno recombinante Man e 5 [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

RESUMO

A alergia alimentar (AA) é caracterizada como uma reação adversa do sistema imune após exposição a um determinado alimento, geralmente desencadeada por uma proteína. Sua prevalência tem aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas, principalmente em países desenvolvidos. Estima-se que mais de 220 milhões de pessoas no mundo sofrem com alguma AA. Foram descritas reações alérgicas a mandioca, mas até o momento apenas Man e 5 é reconhecida como um alérgeno. Sabe-se que esta proteína possui reatividade cruzada com um dos principais alérgenos do látex, o Hev b 5. A mandioca é um alimento amplamente consumido em diversos lugares do mundo, principalmente em países em desenvolvimento devido a sua facilidade de cultivo e diversidade de consumo. Estudos anteriores avaliaram a resposta IgE de indivíduos com alergia à mandioca, mas até o momento nenhum relacionado a resposta celular. Portanto, o objetivo deste estudo foi produzir na forma de proteína recombinante o alérgeno Man e 5 (rMan e 5) e avaliar a resposta celular dos indivíduos alérgicos a mandioca após estímulo com essa proteína em cultura. Utilizamos células de oito indivíduos com alergia confirmada à mandioca e as testamos contra células de seis indivíduos não alérgicos, que serviram como grupo controle para os testes com rMan e 5 produzida em células HEK293. Além disso, foi avaliada a produção e expressão gênica de IFN- γ , IL-10 e IL-13 por ensaio imunoenzimático e PCR em tempo real, respectivamente. Com os resultados obtidos, observamos maior produção de IFN- γ no grupo controle em relação ao grupo alérgico. Também foi visto que a rMan e 5 em concentração de 50 μ g/ml aumenta a produção de IFN- γ no grupo alérgico em relação ao estímulo com 10 μ g/ml. Visto isso, podemos concluir que na presença de rMan e 5 há um aumento significativo na produção de IFN- γ , que já se mostrou importante na indução da tolerância em AAs. Entretanto, novos testes com um número maior de indivíduos são necessários para elucidar melhor a resposta imune celular de alérgicos a mandioca.

Palavras-chave: Hipersensibilidade alimentar. *Manihot*. Alérgenos. Proteínas recombinantes. Linfócitos T. Interferon-gama.

Alves SP. Evaluation of cellular immune response in individuals allergic to cassava with recombinant allergen Man e 5 [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

ABSTRACT

Food allergy (FA) is characterized as an adverse reaction of the immune system after exposure to a certain food, usually triggered by a protein. Its prevalence has increased considerably in the last two decades, especially in developed countries. It is estimated that more than 220 million people worldwide suffers with FA. Allergic reactions against cassava have been described, with only one recognized allergen, Man e 5. It is known that this protein has cross-reactivity with one of the main latex allergens, Hev b 5. Cassava is a food widely consumed in different parts of the world, mainly in developing countries due to its easy cultivation and diversity of consumption. Previous studies have evaluated the IgE response of individuals with cassava allergy, but so far none related to the cellular immune response. Thus, the objective of this study was to produce the recombinant protein form of the Man e 5 allergen (rMan e 5), and evaluate the cellular response of individuals allergic to cassava after stimulation with this protein in culture. We used cells from eight individuals with confirmed cassava allergy and tested them against six non-allergic individuals, used as a control group for tests with rMan e 5 produced in HEK293 cells. Furthermore, we evaluated the production and gene expression of IFN- γ , IL-10 and IL-13 by enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR, respectively. In our results, we observed increase production of IFN- γ in the control group compared to the allergic group. It was also seen that rMan e 5 at a concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ increases the production of IFN- γ in the allergic group in relation to the stimulus with 10 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, we can conclude that in the presence of rMan e 5 there is a significant increase in the production of IFN- γ , which has already been shown to be important in inducing tolerance in FAs. However, new tests with a larger number of individuals are needed to better elucidate the cellular immune response of those allergic to cassava.

Keywords: Food hypersensitivity. *Manihot*. Allergens. Recombinant proteins. T-lymphocytes. Interferon-gamma.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alergia

A palavra alergia vem do grego “*allos*” e “*ergo*”, que significa “diferente” e “atividade”, respectivamente. Foi utilizada pela primeira vez em 1906 para se referir a uma reação alterada no sistema imunológico. Atualmente, a alergia é definida como uma reação exacerbada do sistema imune frente a antígenos inicialmente inofensivos, denominados de alérgenos¹. A maioria dos alérgenos são proteínas com baixa massa molecular, comumente presentes em ácaros de poeira doméstica, epitélio e saliva de animais, alimentos, pólen e substâncias químicas ligadas a proteínas².

Exposições recorrentes a alérgenos podem causar doenças alérgicas crônicas e danos teciduais. As doenças alérgicas podem se desenvolver em pessoas de todas as idades, afetando aproximadamente 25% da população em países desenvolvidos. As alergias mais comuns são rinite, asma, dermatite atópica e alergia alimentar (AA)³. Estima-se que cerca de 500 milhões indivíduos da população global tenham rinite ou asma, com um número crescente de casos a cada ano⁴. De acordo com a Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (EAACI), mais de 150 milhões de europeus sofrem de doenças alérgicas crônicas e estima-se que até 2025 mais de 50% da população europeia desenvolverá pelo menos um tipo de alergia⁵. Estudos demonstraram que o agravamento da poluição atmosférica e das alterações climáticas, bem como aumento de açúcares e gorduras saturadas na dieta e migração de áreas rurais para um ambiente mais urbanizado, podem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças alérgicas⁶. Além disso, segundo a hipótese da higiene, acredita-se que a falta de exposição a microrganismos e patógenos ambientais suprima o desenvolvimento da tolerância imunológica, aumentando assim a suscetibilidade às alergias⁴.

Embora possam ser desencadeadas em diversos tecidos, as reações alérgicas são mais frequentes na pele e mucosas, uma vez que são as primeiras barreiras entre o indivíduo e o ambiente^{2,7}. Sabe-se que crianças com dermatite atópica, condição na qual a barreira epidérmica do indivíduo é disfuncional, possuem risco elevado para sensibilização à alérgenos, uma vez que esta doença causa inflamação e maior permeabilidade na pele, facilitando a entrada de alérgenos⁸. Assim como na pele, a mucosa intestinal aumenta a absorção de alérgenos quando há aumento de permeabilidade nessa barreira, podendo ser provenientes de danos epiteliais ou inflamação (como exposição a toxinas ou trauma)⁹.

Essa reação exacerbada do sistema imune contra alérgenos é denominada como hipersensibilidade. As reações de hipersensibilidade são classificadas em quatro tipos: tipo I, reação imediata e mediada por imunoglobulina E (IgE), comumente relacionada a asma, rinite, dermatite atópica e AA; tipo II, reação citotóxica mediada por IgG ou IgM, relacionada a reações a medicamentos e doenças autoimunes; tipo III, reação mediada por imunocomplexos, relacionada a patologias como doença do soro, reação de Arthus e lúpus eritematoso sistêmico; e tipo IV, reação tardia mediada por células T, relacionada a dermatite de contato, doença celíaca e hipersensibilidade a drogas¹⁰. Os três primeiros tipos de hipersensibilidade são considerados reações imediatas, pois ocorrem em até 24 horas após contato com o alérgeno, enquanto a hipersensibilidade do tipo IV é considerada uma reação tardia, podendo ocorrer 24 horas após a exposição ao alérgeno¹¹.

1.2. Fisiopatologia da alergia

As hipersensibilidades envolvem mecanismos da resposta imune inata e adaptativa com um perfil de resposta inflamatória tipo 2. Esse tipo de resposta é mediado por células T auxiliares do tipo 2 (Th2, do inglês *T Helper Cell Type 2*), que produzem citocinas e interleucinas (IL) IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, além de promover a proliferação e troca de classe de isotipo para IgE em células B. Também estão envolvidas células T auxiliares foliculares (Tfh, do inglês *T Follicular Helper Cells*), células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2, do inglês *Type 2 Innate Lymphoid Cells*) e células efetoras da resposta imune, como basófilos, mastócitos e eosinófilos¹².

A hipersensibilidade tipo I IgE mediada pode ser dividida em duas fases: sensibilização e efetora, representadas na Figura 1. A fase de sensibilização pode ocorrer após o primeiro ou enésimo contato do sistema imune com um determinado alérgeno. O alérgeno depositado nas células epiteliais da pele, trato respiratório ou intestino é capturado e processado pelas células dendríticas (DC), que então migram para os linfonodos, onde apresentam o antígeno para o receptor de célula T (TCR, do inglês *T-cell Receptor*) das células T CD4+ imaturas através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) de classe II. Estas células T então se diferenciam em um perfil de células Th2 alérgeno-específicas e secretam altos níveis de IL-4 e IL-13. No centro germinativo, células Tfh também secretam IL-4 e IL-13, promovendo a troca de classe das células B e tornando-

as células plasmáticas secretoras de IgE¹³. Essa IgE-específica se liga a receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) presentes na superfície de mastócitos e basófilos (células efetoras), tornando o indivíduo sensibilizado para aquele alérgeno^{2,7}. A ILC2 também é ativada após exposição ao alérgeno, através de citocinas secretadas pelas células epiteliais (chamadas alarminas), como IL-25, IL-33 e linfopoiatina estromal tímica (TSLP, do inglês – *Thymic Stromal Lymphopoietin*). Por sua vez, a ILC2 produz grandes quantidades de IL-5, IL-9 e IL-13, amplificando ainda mais a resposta das células Th2^{8,10}. Um conjunto de células Th2 e células B de memória alérgeno específicas também são geradas nesta fase¹⁴.

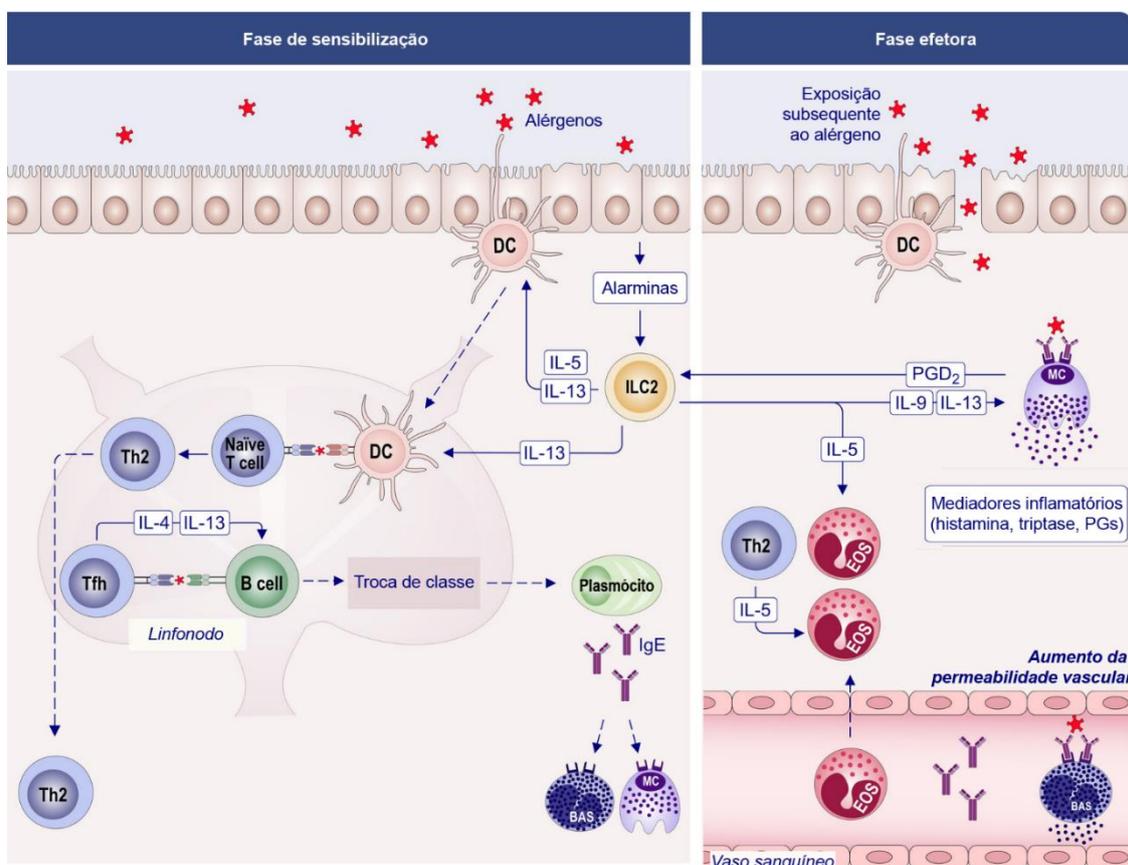


Figura 1. Esquema representativo da fase de sensibilização e efetora da alergias. Na fase de sensibilização ocorre a primeira exposição ao alérgeno, que é capturado pelas células dendríticas (DC) e apresentado às células T CD4+ imaturas (*naive T cell*) nos linfonodos. Essas células se diferenciam em células Th2 e juntamente com células Tfh estimulam, através de IL-4 e IL-13, a troca de classe de células B para células produtoras de IgE. As IgEs ligam-se aos receptores FcεRI presentes em mastócitos e basófilos. A fase efetora ocorre após uma exposição subsequente ao alérgeno previamente sensibilizado. Mastócitos e basófilos são ativados e liberam mediadores inflamatórios como histamina, triptase e prostaglandinas (PGs), além de ativar células Th2 e ILC2 que contribuem para inflamação, causando os sintomas clínicos da alergias. Fonte: Adaptado de Jutel, Marek, *et al.* (2023)¹⁰.

A fase efetora ocorre após uma nova exposição ao alérgeno. A ligação do alérgeno em pelo menos um sítio de duas moléculas de IgE adjacentes leva à formação do complexo alérgeno-IgE-FcεRI, e a consecutiva ativação e degranulação dos mastócitos e basófilos, que liberam mediadores inflamatórios pré-formados responsáveis pelos sintomas que ocorrem imediatamente após contato com o alérgeno e pela inflamação aguda. Dentre esses mediadores estão a triptase, quimase e histamina, que ocasionam contração na musculatura ao redor dos brônquios, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e produção de muco, podendo levar a edema, urticária e anafilaxia⁷. Também ocorre a síntese de metabólitos lipídicos do ácido araquidônico como prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador plaquetário, além da síntese de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e fator de necrose tumoral. A combinação de todos esses mediadores amplifica a inflamação do tecido afetado, recrutando leucócitos para o local. Em uma resposta clínica tardia, eosinófilos ativados liberam citocinas e substâncias tóxicas que promovem, principalmente, danos teciduais¹³. Resumidamente, é necessário que haja uma exposição prévia ao alérgeno para que ocorra a mudança de classe para IgE e sensibilização dos mastócitos, para quando houver um novo contato com o alérgeno, ocorra de fato uma reação alérgica com sintomas clínicos^{2,7,15}.

A hipersensibilidade tipo II se dá pela reatividade de anticorpos contra antígenos ligados à superfície celular, levando a citólise pela ativação da via clássica do sistema complemento, ou pelo mecanismo de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC, do inglês *Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity*), onde células efectoras destroem células alvo que estão recobertas por esses anticorpos^{2,7}.

A hipersensibilidade tipo III é mediada por anticorpos, IgM e IgG, que se ligam a antígenos solúveis, como medicamentos ou venenos, formando complexos antígeno-anticorpo que ativam o sistema complemento, levando a inflamação e danos teciduais¹⁰.

A hipersensibilidade IV é mediada por células T CD4+ e CD8+ sensibilizadas contra algum antígeno. Essas células ativam ILCs, células *Natural Killer* (NK), eosinófilos e macrófagos, que por sua vez liberam citocinas e quimiocinas, causando lesões teciduais e potencial formação de granulomas^{7,10}.

As hipersensibilidades ocorrem pela falha do sistema imune em desenvolver tolerância a um alérgeno específico. As células T regulatórias (Treg) são essenciais para essa tolerância e prevenção de reações alérgicas, exercendo funções imunossupressoras

em células Th2, bloqueando a degranulação de mastócitos, além de aumentar a produção de IgA e IgG4 e diminuir a produção de IgE¹⁶. Devido sua alta afinidade pelo FcεRI, a maior parte da IgE presente no organismo está ligada às células efectoras. A concentração da IgE no plasma chega a ser 105 vezes menor quando comparada a IgG circulante¹⁷. Sabe-se que a diminuição dos níveis de IgE e o aumento da IgG4 específica podem ocorrer como parte da resposta adaptativa após exposição repetitiva a altas concentrações de alérgenos, como na imunoterapia alérgeno específica. Assim como a IgE, a IgG4 é induzida durante a resposta das células Th2, porém em um cenário de tolerância, onde a troca e produção de classe IgG4 é estimulada ao invés da IgE. A IgG4 pode competir com a IgE pela ligação ao alérgeno, como um anticorpo bloqueador, sem causar ativação de células efectoras. A IgA presente nas secreções das mucosas também é capaz de se ligar a alérgenos formando imunocomplexos, bloqueando sua passagem pela barreira da mucosa e conseqüentemente da circulação, assim impedindo uma resposta imune mediada por IgE^{7,17}.

As manifestações clínicas da alergia variam de acordo com o sistema afetado. No sistema gastrointestinal podem ocorrer dores abdominais, vômitos e/ou diarreia. No sistema tegumentar são observadas erupções cutâneas, prurido e/ou angioedema e nos sistemas respiratório e cardiovascular pode haver broncoconstrição, dispnéia, rinorreia, edema, vasodilatação, hipotensão e, em casos graves, choque anafilático¹⁸. A anafilaxia ocorre quando dois ou mais desses sistemas são afetados¹⁹.

1.3. Alergia alimentar

A AA é caracterizada como uma reação adversa do sistema imune após exposição a um determinado alimento, geralmente desencadeada por uma proteína, que resulta em uma resposta IgE-mediada, não IgE-mediada ou mista. Os principais alimentos alergênicos, conhecidos como “*the big 9*”, são leite de vaca, ovo de galinha, amendoim, nozes, soja, trigo, peixe, frutos do mar e gergelim²⁰. A importância de cada um deles varia de acordo com o país ou região²¹.

É importante ressaltar que a AA é diferente da intolerância alimentar, uma vez que a intolerância não está relacionada a uma resposta imune e sim outros mecanismos, como fatores inerentes do alimento (presença de toxinas) e distúrbios metabólicos do indivíduo (por exemplo, deficiência da enzima lactase)^{2,9}.

As manifestações clínicas da AA variam de acordo com o tecido afetado e a resposta imune envolvida¹⁶. Na alergia IgE-mediada os principais sintomas clínicos são presença de prurido, urticária e angioedema, nas não IgE-mediadas são vômitos, diarreias e presença de sangue nas fezes, e nas alergias de mecanismo misto são regurgitação, vômitos e disfagia⁹.

A resposta IgE-mediada na AA está associada a reações graves e potencialmente fatais. Em indivíduos previamente sensibilizados os sintomas clínicos podem ser desencadeados minutos após contato com o alimento. Após ingestão e absorção pelo epitélio intestinal, os antígenos derivados dos alimentos ligam-se à IgE presente em mastócitos e basófilos, ativando essas células efetoras via complexo antígeno-IgE-FcεRI e assim liberando mediadores inflamatórios. No trato gastrointestinal esses mediadores provocam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, causando angioedema e hiperemia da mucosa intestinal, contração do músculo liso e a produção de muco, resultando em vômitos e diarreia²². A detecção de IgE-específica no plasma para um determinado alimento não está necessariamente atrelada à AA, a não ser que venha acompanhada de sintomas clínicos após a ingestão do alimento. Um fator importante para a tolerância e resolução desse tipo de hipersensibilidade é a força de ligação da IgG e IgE para o mesmo alérgeno, uma vez que a ligação do alérgeno com a IgG impede que o mesmo se ligue ao complexo IgE- FcεRI, impedindo a ativação das células efetoras e assim, as manifestações clínicas da alergia^{17,23}.

As respostas independentes de IgE afetam, principalmente, o trato gastrointestinal. Trata-se de uma resposta tardia, geralmente crônica, com os sintomas clínicos se manifestando horas ou dias após contato com o alérgeno alimentar²⁴. As células T parecem desempenhar um papel importante na fisiopatologia da síndrome de enterocolite induzida por proteína alimentar (FPIES, do inglês *Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome*), proctocolite induzida por proteína alimentar (FPIAP, do inglês *Food Protein-Induced Allergic Proctocolitis*) e enteropatia induzida por proteína alimentar (FPE, do inglês *Food Protein-Induced Enteropathy*), porém os mecanismos envolvidos ainda são pouco caracterizados. São síndromes que afetam bebês entre o primeiro ao nono mês de vida e o desenvolvimento espontâneo de tolerância oral ocorre após 1 a 5 anos. Os principais alimentos alergênicos associados a esse grupo são leite de vaca, soja, arroz e aveia. Por falta de testes laboratoriais específicos, o diagnóstico se dá

através da história clínica e teste de provocação oral (TPO), e o tratamento consiste na eliminação completa do alérgeno da dieta²⁵.

Uma terceira classe de fisiopatologia na AA é a mista, que envolve uma combinação de vias dependentes e independentes de IgE (resposta celular). As manifestações clínicas estão associadas a distúrbios gastrointestinais eosinofílicos, como esofagite eosinofílica, geralmente desencadeada por proteínas presentes no leite de vaca e subsequente infiltração de eosinófilos nos tecidos afetados, além de distúrbios dermatológicos, como dermatite atópica com envolvimento de células Th2^{22,26}.

Outro fator importante a ser levado em consideração na AA é a reatividade cruzada entre alimentos. A reatividade cruzada ocorre quando a IgE reconhece, se liga e induz uma resposta imune contra moléculas alergênicas semelhantes (homólogas). A reatividade cruzada de IgE ocorre frequentemente entre proteínas que possuem sequências de aminoácidos similares e é relevante no contexto imunológico podendo ocasionar sensibilizações contra novos alimentos²⁷.

1.3.1. Epidemiologia

Dados epidemiológicos sobre a prevalência da AA são conflitantes, pois variam de acordo com idade, características populacionais, mecanismos imunológicos envolvidos, método de diagnóstico, tipo de alimento e regiões geográficas. O consenso é que a prevalência aumentou drasticamente nas últimas duas décadas, se tornando um grande problema de saúde pública nos países desenvolvidos^{28,29}. Esse aumento exponencial é resultado de fatores ambientais, estilo de vida e predisposição genética³⁰.

O que torna tão difícil estimar a prevalência é que para o diagnóstico confirmatório da AA, o teste padrão-ouro é o TPO, que consiste em ingerir o alimento suspeito de causar alergia, para monitoramento de possíveis reações. Devido ao seu grande risco de desencadear respostas alérgicas exacerbadas, como anafilaxia, esse procedimento só pode ser realizado em ambiente hospitalar ou centros especializados, sob supervisão médica³¹. Uma pesquisa global sobre AA em crianças realizada em 2013 constatou que apenas 10% de 89 países apresentavam dados precisos de prevalência baseados em TPO³². Atualmente a maioria dos dados se baseia em taxas de internações hospitalares por anafilaxia e autorrelatos da doença, que tendem a superestimar a prevalência da AA,

uma vez que outras patologias podem estar envolvidas, como intolerâncias ou intoxicações³³.

Estima-se que a AA afete mais de 220 milhões de pessoas mundialmente³⁰, com taxas mais altas em crianças do que em adultos, sendo 6% em menores de três anos e 3,5% em adultos³⁴. Na maioria dos casos reportados, o mecanismo imunológico envolvido são reações mediadas por IgE. A Austrália apresenta a maior prevalência nesta categoria, com 10% de lactentes com AA confirmada por TPO a alimentos alergênicos comuns na infância, como ovo, amendoim e/ou gergelim³⁵. Taxas de AA confirmada por TPO em crianças variam de 1% na Tailândia a 3% na China e até 5% no Reino Unido³⁶. Na Europa e Estados Unidos, as estimativas de prevalência são de 1% a 5%. Nos Estados Unidos, entre 1997 e 2011 houve um aumento de 3,4% para 5,1% de AA em crianças²². Existem poucos relatos na literatura confirmados por TPO sobre a prevalência em adultos, mas um estudo demonstrou prevalência de 3,2% em uma população dinamarquesa³⁷.

Com a maioria dos dados sendo provenientes dos Estados Unidos e Europa, pouco se sabe sobre a prevalência da AA na América Latina, onde hábitos alimentares são diferentes, desde a variação ao preparo dos alimentos consumidos. Nos Estados Unidos, os alimentos mais frequentemente associados a alergias em crianças são leite de vaca, ovo, trigo, frutos do mar, amendoim, nozes e soja, enquanto no México reações de hipersensibilidade alimentar são mais frequentes ao chocolate, morango, frutos do mar e ovo, no Chile a nozes e amendoim, em El Salvador a pimenta, nozes, chocolate, leite e camarão, e na Colômbia a frutas, vegetais e frutos do mar³⁰. No Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do HCFMUSP o quinto alimento mais implicado em AA é o milho, que não costuma aparecer em listas de outros países.

O Brasil é o país da América Latina com maior índice de artigos publicados relacionados à AA³⁸, mas apenas três deles são sobre epidemiologia. Em 2004, Naspitz *et al.* avaliaram os níveis de IgE total e específico em 457 crianças que faziam acompanhamento em centros de alergia pediátrica em cinco regiões do Brasil, e de 62 crianças controle. A presença de IgE total foi maior entre os indivíduos alérgicos (79%) do que nos controles, sendo a principal fonte de alimento alergênico o peixe, seguido por ovo, leite de vaca, amendoim, soja e milho³⁹. Em 2007, Tassi *et al.* descreveram que 23,6% de pacientes com dermatite atópica relataram exacerbação dos sintomas após consumo de algum alimento⁴⁰. Em 2015, em uma população de Uberlândia, Gonçalves

et al. observaram prevalência de sintomas relacionados à AA relatada por pais de 17,6% em crianças de 4 meses a 5 anos. Os principais alimentos citados foram leite de vaca, carne suína, frutas, chocolate e ovo. Após avaliação clínica e laboratorial, a prevalência de alergia alimentar encontrada foi de apenas 4%, com o ovo sendo o principal alérgeno alimentar, seguido pelo leite de vaca e trigo⁴¹.

1.3.2. Diagnóstico e tratamento

Na avaliação diagnóstica de AA a história clínica possui um papel fundamental, associado ao exame clínico, para auxiliar na caracterização do tipo de reação, diferenciando a hipersensibilidade de outras condições. Além disso, as características relacionadas ao alimento consumido, como a quantidade e os tipos de sintomas apresentados no momento de ingestão também devem ser considerados²².

Uma vez estabelecida a suspeita de AA, a dosagem dos níveis séricos de IgE (total e alérgeno-específico) e testes cutâneos (*prick test* e *prick to prick*) com o alimento suspeito ou com extratos comerciais são recomendados, embora sozinhos não confirmem o diagnóstico. No *prick test* aplica-se uma gota de extrato alergênico sobre a pele, que é picada com uma lanceta. No *prick to prick* é aplicado um puntor no alimento e em seguida na pele do antebraço do indivíduo. O resultado se dá pela formação, ou não, de pápulas na pele⁴².

A presença de IgE sérica não significa necessariamente alergia, apenas sensibilização do indivíduo, podendo nunca apresentar manifestações clínicas. A dosagem sérica de IgE e os testes cutâneos estão associados a uma alta taxa de falsos positivos, com especificidade inferior a 50%²³, devido à reatividade cruzada entre proteínas homólogas e à natureza dos extratos. Os extratos comerciais utilizados nos testes cutâneos não são padronizados entre as empresas que os comercializam. Eles são obtidos a partir do alimento alergênico e geralmente são compostos por uma mistura de substâncias alergênicas, como proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos, e não alergênicas, incluindo lipídeos, sais e metabólitos³⁴. Idealmente os extratos deveriam conter apenas moléculas alergênicas purificadas para melhor especificidade dos testes⁴³.

Até o momento, o único teste confirmatório para o diagnóstico da AA é o TPO, em que doses crescentes do potencial alimento alergênico são ingeridas até que ocorra ou não uma reação alérgica. Quando não ocorrem manifestações clínicas até a finalização do teste, o alimento pode ser incorporado na dieta. Quando sintomas clínicos ocorrem durante o teste, é confirmado o diagnóstico de AA⁴⁴. Entretanto, deve ser feita uma

avaliação cuidadosa para determinar se há necessidade de realizar o teste, pois existem grandes riscos de anafilaxia, além de que o mesmo só pode ser conduzido em ambientes hospitalares ou centros especializados, o que acaba aumentando o custo do procedimento¹⁵. Novas avaliações diagnósticas, como testes de ativação de basófilos e IgE específica contra epítomos alergênicos parecem promissoras, porém com disponibilidade limitada, sendo feito em poucos lugares do mundo e ainda sem padronização entre os laboratórios que o realizam³³.

O diagnóstico preciso é essencial para o tratamento personalizado de indivíduos com AA. Atualmente, o tratamento das alergias alimentares consiste na retirada do alimento da dieta, imunoterapias e administração de adrenalina em casos de anafilaxia após exposição acidental²².

A imunoterapia é um tratamento capaz de reduzir a sensibilização e até mesmo dessensibilizar o indivíduo, através da administração de doses graduais do alérgeno. Tem como objetivo induzir a tolerância a longo prazo e subsequentemente reduzir os sintomas característicos da alergia. Por imunomodulação, promove o desenvolvimento de células Tregs, suprime respostas do tipo Th2, promove redução na ativação de mastócitos e basófilos, reduz os níveis de IgE, além de induzir aumento contínuo de IgG4 específica para o alérgeno em questão^{45,46}.

A imunoterapia pode ser realizada por via oral (OIT), sublingual ou subcutânea, embora a última seja menos utilizada em AA e mais comum no tratamento de rinite alérgica⁴⁷. A OIT consiste na ingestão de doses crescentes do alérgeno em extratos líquidos ou em forma de comprimidos, quando a administração é via sublingual. O tratamento geralmente dura entre 3 a 5 anos e medicamentos associados, como o Omalizumab (anticorpo monoclonal anti-IgE), podem reduzir as reações adversas e melhorar a eficácia da OIT³⁰.

Em 2020, o primeiro medicamento para o tratamento de AA foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA. Palforzia, composto por pó de amendoim padronizado, é um medicamento de OIT para alergia ao amendoim em indivíduos a partir dos 4 anos de idade, podendo ser administrado em casa⁴⁸.

1.4. Alergia à mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), é um arbusto pertencente à família *Euphorbiaceae*, nativa da América do Sul e amplamente cultivada na África, Ásia e América Latina. A raiz da mandioca, conhecida popularmente como aipim, macaxeira,

tapioca ou yucca, possui apenas 1-2% de proteínas e é composta principalmente por amido, além de cálcio, ferro, riboflavina, tiamina e ácido nicotínico⁴⁹. Suas raízes tuberosas são importante fonte de carboidratos e alimentam mais de 800 milhões de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento. Pode ser preparada cozida, frita ou em forma de farinha, além de ser utilizada no preparo de rações e aplicações industriais, como na produção de etanol e biocombustível^{50,51}.

Apesar da variedade de produtos derivados da mandioca, seu consumo pode induzir reatividade cruzada com látex, levando a reações alérgicas. Em 2003, Gaspar *et al.* relataram o primeiro caso de anafilaxia após ingestão de mandioca e constataram reatividade cruzada entre o alérgeno Hev b 7 do látex e mandioca por um teste de inibição de IgE⁵². Em 2004, nosso grupo relatou o caso de duas mulheres sensibilizadas ao látex que apresentaram reação anafilática logo após consumir mandioca cozida⁵³. Na Espanha, em 2007, Ibero *et. al.* descreveram o caso de uma mulher de 27 anos com síndrome látex-fruta que desenvolveu broncoespasmo, prurido nasal e rinorreia após descascar mandioca crua, e constataram reatividade cruzada de IgE entre o alérgeno Hev b 6 do látex e mandioca⁵⁴. Em 2012, Antolin-Amerigo *et al.* relatou o caso de uma mulher colombiana de 47 anos, residente na Espanha, que apresentou anafilaxia após ingestão de mandioca cozida, e constataram reatividade cruzada de IgE entre o alérgeno Hev b 5 do látex e mandioca⁵⁵. Em 2019, Deschampheleire relatou o caso de uma mulher de 23 anos, de Madagascar, com alergia à mandioca sem sensibilização ao látex⁵⁶.

A proteína Man e 5, com massa molecular de 30 kilodalton (kDa), até o momento é o único alérgeno da mandioca reconhecido pela IUIS (União Internacional das Sociedades Imunológicas). Trata-se de uma proteína rica em ácido glutâmico, extremamente lábil a ação da pepsina e ao baixo pH do suco gástrico, sendo degradada em segundos. Possui sequência de 42% de identidade com Hev b 5, que está entre os alérgenos mais importantes da *Hevea brasiliensis* (látex), afetando 1-2% da população mundial, com alta prevalência em profissionais da saúde. Em 2013 nosso grupo de pesquisa demonstrou que mais de 70% de indivíduos alérgicos à mandioca e ao látex são IgE reativos para Man e 5, e que esse alérgeno possui reatividade cruzada de IgE com a molécula homóloga Hev b 5, sugerindo que a reatividade de IgE para a mandioca pode ocorrer em consequência da sensibilização prévia ao Hev b 5⁵⁷. Recentemente, em 2023, nosso grupo de pesquisa caracterizou outra proteína alergênica da mandioca, a

FBA (frutose-bifosfato aldolase), com massa molecular 36 kDa, que demonstrou ser reconhecida por 80% dos indivíduos alérgicos a mandioca do estudo, além de sugerir possível reatividade cruzada com látex. Outras cinco proteínas da mandioca foram identificadas como IgE reativas nesse estudo, GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), com massa molecular de 36 kDa, alfa 1,4 glucano fosforilase, com massa molecular de 100 kDa, peptidase S9, com massa molecular de 72 kDa, citosol AP, com massa molecular de 60 kDa e ATP sintase, com massa molecular de 55 kDa⁵⁸. Até o momento a maioria dos estudos relacionados a alergia à mandioca são voltados para análises proteômicas, não havendo descrição na literatura sobre a resposta imune celular desse tipo de alergia, tornando nosso estudo pioneiro nesse quesito.

2. JUSTIFICATIVA

Diversos trabalhos demonstraram a participação de IgE e linfócitos Th2 em reações alérgicas. Embora a presença de IgE específica contra alérgenos da mandioca tenha sido descrita, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa, ainda não há informações na literatura sobre resposta de células T contra esses mesmos alérgenos. Sabe-se que existem diferenças de imunodominância de alguns alérgenos entre reatividade de IgE e reatividade de células T, ou seja, alguns alérgenos que são predominantemente reconhecidos por células T foram relatados como alvos menos reativos à IgE e vice-versa^{59,60}. Dessa maneira, avaliamos a resposta celular de indivíduos alérgicos à mandioca após estímulo com a proteína recombinante Man e 5, afim de melhorar a caracterização desse alérgeno, além de obter um melhor entendimento a respeito do mecanismo alérgico envolvendo células T na alergia à mandioca e na alergia alimentar em geral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produzir a proteína Man e 5 na forma recombinante e avaliar a resposta celular de indivíduos com alergia confirmada à mandioca.

3.2. Objetivos específicos

- Utilizar a proteína Man e 5 recombinante como estímulo em cultura celular de indivíduos alérgicos a mandioca;
- Avaliar a produção intracelular das citocinas IL-10, IL-13 e IFN- γ ;
- Avaliar a expressão gênica de IL-13 e IFN- γ ;
- Avaliar a produção das citocinas IL-13 e IFN- γ em sobrenadante de células estimuladas com a proteína Man e 5 recombinante.

4. MÉTODOS

4.1. Seleção de indivíduos

Os indivíduos com alergia à mandioca selecionados para este estudo são os mesmos participantes no projeto intitulado “Imunoterapia oral com mandioca em pacientes alérgicos a mandioca e ao látex” aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) (CAAE: 10420619.6.0000.0068), conduzido por Roberta Castro Araújo, sob supervisão do Prof. Dr. Fábio Castro, no Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). A partir deste estudo prévio foram selecionados oito indivíduos do sexo feminino, com faixa etária média de 53 anos e com alergia confirmada à mandioca (por teste cutâneo, IgE sérica e avaliação clínica) (Tabela 1). O soro e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) desses indivíduos encontravam-se armazenados em freezer a -20°C e em nitrogênio líquido, respectivamente. Esse material foi utilizado para realização dos experimentos *in vitro*.

Os indivíduos do grupo controle estão incluídos no estudo “Identificação e caracterização dos alérgenos da mandioca” (CAAE: 30801420.7.0000.0068) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para coleta de sangue e obtenção de soro e CMSP, número do parecer: 4.975.492 (Anexo A). Foram selecionados seis indivíduos do sexo feminino, com faixa etária média de 50 anos, não alérgicos a mandioca, sem AA em geral e não profissionais da saúde, para reduzir as chances de reatividade cruzada entre proteínas da mandioca e látex (Tabela 2).

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos indivíduos alérgicos à mandioca utilizados neste estudo.

Indivíduo	Idade	Sexo	Grupo de risco		Primeiros sintomas		<i>Prick to prick</i>	
			Cirurgias prévias	Profissional da saúde	Látex	Mandioca	Mandioca crua	Látex
1	72	F	9	Não		x	19x10mm	6x7mm
2	55	F	1	Sim		x	10x9mm	0mm
3	61	F	3	Sim	x		6x7mm	3x3mm
4	55	F	1	Sim	x		5x4mm	4x4mm
5	31	F	0	Sim		x	4x3mm	0mm
6	37	F	5	Sim		x	16x9mm	9x6mm
7	52	F	1	Sim	x		6x5mm	8x5mm
8	63	F	4	Sim	x		12x6mm	6x5mm

Grupo de risco: contato prévio com látex. ***Prick to prick:*** positivo $\geq 3 \times 3$ mm.

Tabela 2. Dados demográficos dos indivíduos do grupo controle sem alergia alimentar.

Indivíduo	Idade	Sexo	Profissional da saúde
9	63	F	Não
10	35	F	Não
11	51	F	Não
12	38	F	Não
13	71	F	Não
14	47	F	Não

4.2. Plasmídeo para expressão da proteína Man e 5 recombinante

O gene de interesse Man e 5 (664 pb) foi desenhado e otimizado 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). O gene desenhado foi sintetizado (GenOne Biotech©) e clonado no vetor de expressão pcDNA3.1 (Thermo Fisher), utilizando-se as enzimas de restrição HindIII e Xho I (Invitrogen).

4.3. 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 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 contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma) e estas foram incubadas a 37°C durante 14-16h para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

4.4. 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. Após esse período, o material foi centrifugado a 4.000 g 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 *Preceptation 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 g 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 g por 5 minutos a 4°C. Após secagem do *pellet* ao ar livre, o mesmo foi ressuscitado em 300µl de água estéril livre de endotoxinas.

4.5. Quantificação e avaliação do plasmídeo purificado

Após purificação foi realizada a quantificação e a avaliação do plasmídeo purificado. A quantificação do plasmídeo foi realizada por método espectrofotométrico (NanoDrop, Thermo Fisher). A avaliação da integridade do plasmídeo foi realizada utilizando as enzimas de restrição HindIII e XhoI. 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; 40% de sacarose em água) e o material foi submetido à eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8) à 120V por aproximadamente 1 hora. O *Ready-load 1Kb plus DNA ladder* (Invitrogen) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio (Invitrogen) e a visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no aparelho *MultiImage Light Cabinet* (Alpha Innotech).

4.6. Expressão da Man e 5 recombinante 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 CO₂, até atingirem a densidade necessária para transfecção. O protocolo seguido para cultivo, manutenção e expressão da proteína recombinante é o recomendado pelo fabricante⁶². No momento da transfecção as células Expi293F, ajustadas para a densidade de 3x10⁶ células/mL, foram suspensas em um novo Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de expressão (Expi293™ Expression Medium, A1435101). Para o preparo de 100 ml de meio utilizamos 300x10⁶ células. Após 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 µl de *Expi Fectamine Transfection Reagent* (ThermoFisher) e no segundo tubo foi adicionado 100 µg 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 µl) e *Transfection Enhancer 2* (6 mL). O tempo para expressão da proteína de interesse foi de cinco dias em cultura. Após esse período, o meio de cultura contendo a proteína recombinante foi coletado e centrifugado a 3200 g por 30 minutos para remoção das células. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 µm e submetido a purificação de proteínas em coluna de cromatografia por afinidade a metais (IMAC).

4.7. Purificação da Man e 5 em coluna de cromatografia por afinidade a metais

Devido a presença da 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 a 4°C. Em seguida, o material foi adicionado em uma coluna de plástico de 20 mL para

cromatografia, onde ocorreu o empacotamento da resina. Essa resina 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, afim de favorecer o desligamento da histidina da proteína da resina. Todas as frações coletadas foram dosadas no espectrofotômetro ND 1000 Nanodrop (Uniscience) para confirmação de que a proteína estava eluída nas frações coletadas. Em seguida, foi feita uma diálise para troca de tampão da proteína purificada com 4L de PBS 1x pH 7,4 com 5% de glicina por 2 horas a 4°C e em sequência essa solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm. A concentração da proteína após diálise e filtragem foi novamente dosada no espectrofotômetro ND 1000 Nanodrop (Uniscience).

4.8. Eletroforese 1D e Western blotting com a proteína Man e 5 recombinante

Para visualização da Man e 5 recombinante (rMan e 5) produzida foi feito um ensaio de eletroforese de primeira dimensão (1D) em diferentes concentrações da proteína. A separação da proteína foi realizada 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 15 mA/gel durante 15 minutos (até a entrada da amostra no gel de resolução) e de 35 mA/gel até o fim da corrida. Diferentes concentrações da rMan e 5 (3, 7, 10 e 15 µg) foram aplicadas em cada poço do gel. O marcador molecular utilizado foi *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen). O gel foi corado com *Coommassie Blue Coloidal* (CBC), como descrito por Candiano *et al.* (2004)⁶². A imagem do gel foi capturada utilizando o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

A proteína separada em gel de poliacrilamida 12% foi eletrotransferida do gel para membrana de nitrocelulose em um sistema de eletrotransferência *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad Califórnia, USA) para realizar *Western Blotting* (WB). No ensaio de WB para detecção de IgE específica para rMan e 5 foi utilizado um *pool* de soro de dois indivíduos (2 e 7), com alergia à mandioca e com prévia reatividade IgE específica contra a Man e 5 confirmada, e o soro de um indivíduo não alérgico à mandioca como controle negativo. O anticorpo secundário utilizado foi Anti-IgE

humano produzido em camundongos (ϵ -específica) e conjugado à *Horseradish Peroxidase* (HRP) (Invitrogen).

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-Tween 20 a 0,1% (v/v) e leite em pó desnatado 5% (m/v) por 1 hora a 4°C. Os soros 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 a 4°C por aproximadamente 16 horas sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween 20 a 0,1 % (v/v), cada lavagem durando 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgE) diluído em TBS-Tween 20 a 0,1 % (v/v) na proporção 1:5000 por 2 horas em temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween 20 a 0,1 % (v/v), cada lavagem durando 10 minutos em temperatura ambiente. Para detecção por quimioluminescência foi utilizado 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. A membrana foi revelada utilizando o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

4.9. Marcação intracelular de citocinas

As CMSP de oito indivíduos com alergia a mandioca e de seis indivíduos controles foram descongeladas e estimuladas, em triplicata, na presença ou ausência de PMA (do inglês, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*; Sigma-Aldrich, P8139) 50 ng/mL e ionomicina 500 ng/mL (Sigma-Aldrich, I3909), juntamente com Brefeldina A (BioLegend, 420601) 1x. O PMA ativa a proteína quinase C enquanto a ionomicina é um agente mobilizador de cálcio, ambos induzem a ativação de células T e a produção de citocinas⁶³. As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo U na concentração de 5×10^5 em volume final de 200 μ L de RMPI completo por poço, em estufa a 37°C por 5 horas. Após o tempo de estímulo as células foram transferidas para uma placa de fundo V e centrifugadas a 400 g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em volume final de 50 μ L de PBS 1x pH 7,4, contendo os anticorpos anti-CD3-Percp Cy5.5 (BD Pharmingen™), anti-CD4-BV421 (BD Horizon™) e anti-CD8-APC-H7 (BD Pharmingen™), ao abrigo da luz por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com 100 μ L de PBS

1x pH 7,4 e incubadas em 50µL de BD Cytotfix/Cytoperm™ por poço, ao abrigo da luz durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente as células foram lavadas com 100µL de BD Perm/Wash™ *buffer* e foram marcadas, ao abrigo da luz, em volume final de 50µL de BD Perm/Wash™ *buffer*, contendo os anticorpos anti-IFN-γ-PECy7 (BD Pharmingen™) e anti-IL-13-PE (BD Pharmingen™) por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 100µL de BD Perm/Wash™ *buffer* e ressuspensas em volume final de 200µL de PBS 1x pH 7,4. As amostras foram adquiridas com o citômetro FACSCanto II (BD Biosciences) e analisadas com o auxílio do software FlowJo (versão 8.7.1, Tree Star).

4.10. Cultura celular com Man e 5 recombinante

As CMSP de oito indivíduos com alergia a mandioca e seis indivíduos controle foram cultivadas na concentração 5×10^6 em volume final de 200µL RMPI completo por poço, na presença ou ausência de 10ug/ml ou 50ug/ml de rMan e 5. Os controles positivos foram estimulados com PMA (P8139, Sigma-Aldrich) 50 ng/mL e ionomicina 500 ng/mL (I3909, Sigma-Aldrich) 48 horas antes do final da cultura. Os controles negativos para PMA e ionomicina foram incubados com RPMI completo, e os controles negativos da Man e 5 foram incubados com PBS 1x pH 7,4 5% glicina (tampão em qual a rMan e 5 está eluída). As células foram mantidas em cultura por 3 ou 6 dias, a 37°C. Após cada período, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até o momento da sua utilização, e as células foram coletadas para extração de RNA.

4.11. PCR em tempo real

Foi realizada PCR em tempo real (qPCR) para determinar a expressão gênica de IL-13, IFN-γ e GAPDH. A extração de RNA total foi feita utilizando TRIZOL™ *Reagent* (Invitrogen). Resumidamente, 500µL de Trizol foram adicionados juntamente com as células e homogeneizados em tubos de 1,5 mL livres de DNase e RNase (Axigen). Após incubação de 5 minutos para completa dissociação do complexo nucleoproteína, foram adicionados 200 µL de clorofórmio a 4°C em cada tubo. Os tubos foram vortexados e, após 3 minutos, centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. A fase superior aquosa contendo o RNA foi transferida para novos tubos livres de DNase e RNase, contendo 1 mL de isopropanol a 4°C, para precipitação do RNA. As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas por 10 minutos. Em seguida, foram

centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado, e o *pellet* de RNA foi ressuspenso em 500 µL de etanol 75% a 4°C, para lavagem do *pellet*. Após centrifugação a 7.600g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol presente nos tubos foi seco em temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. O RNA foi eluído em água tratada com DEPC (dicarbonato de dietila). Em seguida, o RNA total obtido foi tratado para remover qualquer traço de DNA contaminante. Para isso foi adicionado 0,1 do volume da amostra de DNase I *Buffer* 10x e 1 µl de rDNase I ao tubo contendo o RNA, para digestão do DNA. Após incubação de 20 minutos a 37°C foi adicionado o DNase *Inactivation Reagent* para parar a digestão, e a solução foi incubada durante 2 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos e em seguida o RNA foi transferido para um novo tubo. A concentração de RNA foi determinada por método espectrofotométrico (NanoDrop, Thermo Fisher).

O cDNA foi obtido a partir da transcrição reversa do RNA extraído, utilizando *Superscript II Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher). Resumidamente, 1µg de RNA total foi incubado com Oligo(dT)12-18 e dNTP (Thermo Fisher) a 65°C por 5 minutos, nas concentrações recomendadas pelo fabricante. Uma solução contendo DTT, a enzima *Superscript II*, o tampão *First-Strand buffer* (5x) e RNase OUT foi adicionada a cada tubo e os mesmos foram incubados a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos em um termociclador Veriti (Applied Biosystems). A qPCR foi realizada utilizando *Power SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) e o termociclador QuantiStudio 12k (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada com os seguintes parâmetros: 95°C por 15 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O GAPDH foi utilizado como controle endógeno. As sequências dos primers utilizados estão no Apêndice A. Para o desenho dos primers foi utilizado o banco de dados GenBank da NCBI e as ferramentas Primer-BLAST e OligoAnalyzer™. Para genes com mais de uma variação foi considerada a sequência preservada entre as variantes.

4.12. ELISA para detecção de citocinas do sobrenadante

Foi realizado o ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) para detecção das citocinas IL-13 (DY213, R&D Systems) e IFN-γ (DY285B, R&D Systems) no sobrenadante da cultura celular estimulada com rMan e 5, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo

de captura (IL-13 ou IFN- γ) na concentração 2 μ g/mL em volume final de 50 μ L por poço e incubado por 18 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,01% e bloqueadas com 100 μ L de Reagente Diluente (R&D Systems) 1x por poço. Em seguida, após três lavagens com tampão PBS-T 0,01%, foram adicionadas as amostras e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente e após o término deste período, os respectivos anticorpos de detecção foram adicionados às placas na concentração de 200 ng/mL e incubados por duas horas em temperatura ambiente. A seguir, após três lavagens, foi adicionada estreptavidina-HRP (R&D Systems) durante 20 minutos em temperatura ambiente. Seguida de três lavagens, a solução de substrato foi adicionada às placas e após 20 minutos a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda em 450 nm.

4.13. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo *software GraphPad Prism 9*. Comparações entre dois grupos foram feitas utilizando o teste de Mann-Whitney. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo para todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1. Produção da proteína Man e 5 recombinante (rMan e 5)

5.1.1. Análise do plasmídeo codificador de Man e 5

A sequência do gene da proteína Man e 5 foi sintetizada e clonada no vetor de expressão pcDNA3.1 com as enzimas de restrição HindIII e Xho I, além da sequência de Kozak e uma cauda de histidina (Figura 2). O plasmídeo foi transformado em bactéria *E. coli* e, após a transformação foram selecionados dois clones resistentes à ampicilina para posterior extração e purificação do DNA plasmidial. Cada clone extraído foi submetido à digestão enzimática específica para linearização do plasmídeo.

```
AAGCTT GCCACC ATGGACTGGACCTGGATTCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCTACCAGAGTGCACAGC GCTA
CAGCCGAGGTGGTCACCGCCAGACCGCCCTGCCTGAAGAGAAACCTGCTGAGGAGGTGAAGGTGTCC
GAGATCGTGACCGAGGAGGCTGCTCCAGCCGTGGAACCAAGTGGCCGAGGAACCAAGGAAGCCGAGC
CCGTGGCCGTCAGCGAGGAACCAAGGGCGGAGATGACGCCCTGCCGAGGTGGCCGTGGAACCAA
GGAAGTTGTGGAAGTGGAAAGAGGCAAAGACCGTGACCGAGGAACCCACCGTGGAAAAGACCGAGGAA
GAGGAAGAGACACCTAAAGAGGAAACCCCTGAGCCCGTGGTGGTGAAGGAGACACCTAAGGAAGAGC
CTACCGCCGAGACAGTGGTGGAAAGAGGCCCTAAGGAAACAACCGAGGCCGCCACAGAGGCCGAGGC
CCCTGCCCTGAGAGCGCCCGAGCTTCTGCCCTGAGACCCCTGCCGAGGAAGAGGTCCCAAGGAAGA
GGAAGCGACGAGAAGAAAAGCGAGGCCGAGGTGGAAGCTGAGAAGACAGAG CATCACCATCACCAC
CACTGA CTCGAG
```

AAGCTT – sítio HindIII

GCCACCATGG – sequência de Kozak

ATGGACTGGACCTGGATTCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCTACCAGAGTGCACAGC – peptídeo sinal IgE

CATCACCATCACCAC – cauda de histidina

TGA – códon de parada

CTCGAG – sítio XhoI

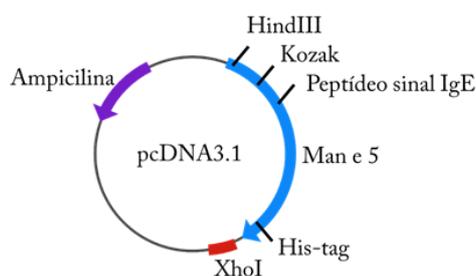


Figura 2. Construção do plasmídeo produtor da proteína Man e 5. Sequência nucleotídica do gene da proteína Man e 5 com otimização de códons para expressão em células de mamíferos, além da sequência de Kozak, peptídeo sinal IgE, cauda de histidina, códon de parada e os sítios das enzimas de restrição HindIII e XhoI. Está também representado o mapa do vetor pcDNA 3.1 utilizado.

A eletroforese em gel de agarose 1% realizada para visualização da efetividade da digestão do plasmídeo contendo o gene da proteína Man e 5, com as enzimas de restrição HindIII e Xho I, mostrou que houve a liberação do inserto com o tamanho próximo ao esperado de 664 pb (Figura 3). Estes dados sugerem que a sequência da Man e 5 desenhada foi inserida de forma correta no plasmídeo pcDNA3.1 e possui o tamanho esperado de pares de bases.

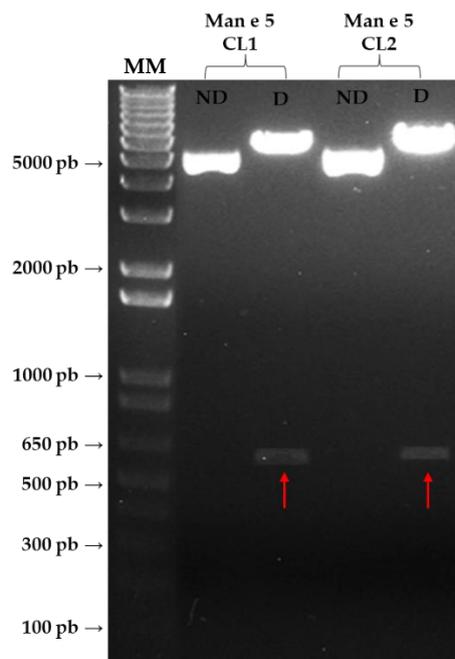


Figura 3. Análise do gene Man e 5 clonado no vetor de expressão pcDNA3.1. Após amplificação e purificação, dois clones (CL1 e CL2) do plasmídeo contendo o gene da proteína Man e 5 foram digeridos com as enzimas de restrição HindIII e Xho I. Para visualização da liberação do inserto foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. O vetor pcDNA3.1 possui 5428 pares de base (pb) e o gene da proteína Man e 5 664 pb. Estão representados o produto da digestão do plasmídeo (D) assim como o plasmídeo não digerido (ND). O marcador molecular (MM) utilizado foi o *Ready-load 1Kb plus DNA ladder*.

O DNA plasmidial extraído, purificado e digerido de um dos clones foi utilizado para transfecção em células eucarióticas Expi293 para produção da proteína recombinante. Após cinco dias de cultura houve a expressão da rMan e 5, que em seguida foi purificada em coluna de níquel com diferentes concentrações de imidazol (50 mM, 250 mM e 500 mM) para recuperar o máximo possível de proteína. Após purificação, a concentração de rMan e 5 obtida foi de 2,27 mg/mL. Foi feita a diálise para troca de tampão da proteína, de imidazol para PBS e em seguida a solução foi filtrada. Após diálise a concentração de rMan e 5 era de 1,87 mg/mL e após filtragem a concentração final de rMan e 5 obtida foi de 1,09 mg/mL.

5.1.2. Análise da reatividade IgE com a proteína rMan e 5

Para visualizar a proteína recombinante produzida, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% com quatro concentrações distintas da rMan e 5 (3, 7, 10 e 15 μg) para visualização da proteína. Pode-se observar uma proteína mais proeminente próximo de 37 kDa, pouco acima de 30 kDa, que é a massa esperada para proteína Man e 5 em um gel SDS-PAGE⁶⁴.

Apesar de já ser possível visualizar de forma bem expressiva a rMan e 5 com 15 μg , utilizamos a concentração de 30 μg de rMan e 5 para o WB, a fim de favorecer a ligação da proteína com as IgEs dos indivíduos. Foi utilizado o *pool* com soros de dois indivíduos alérgicos a mandioca (2 e 7), que já haviam demonstrado reatividade IgE específica para a Man e 5 em estudo anterior⁵⁷. É possível observar a presença de uma proteína reativa na região de 37 kDa no grupo alérgico e uma reatividade mais fraca na mesma região no controle. Interessantemente, tanto no grupo alérgico como no controle podemos visualizar uma reatividade IgE na região entre 64 e 82 kDa (Figura 4B).

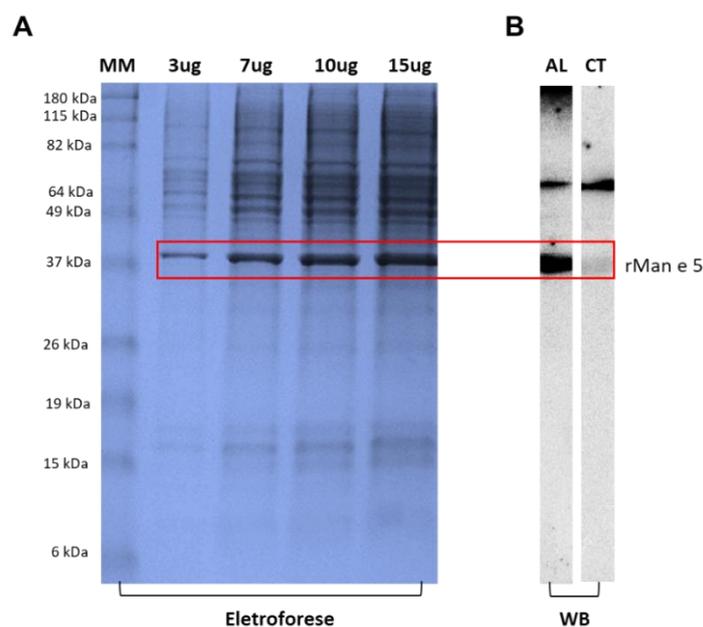


Figura 4. Eletroforese SDS-PAGE e Western Blotting com a proteína Man e 5 recombinante. A. Eletroforese 1D SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% com a proteína recombinante Man e 5 (rMan e 5) em diferentes concentrações (3, 7, 10 e 15 μg). O marcador molecular (MM) utilizado foi *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder*. **B.** Western Blotting (WB) com *pool* de soro de alérgicos a mandioca (indivíduos 2 e 8) e um controle negativo. É possível observar uma proteína IgE reativa no grupo alérgico na região de 37 kDa (kiloDalton), correspondente a rMan e 5, e também uma reatividade na região entre 64 e 82 kDa em ambos os grupos. AL: alérgicos; CT: controle negativo.

5.2. Análise da resposta celular do grupo alérgico a mandioca após estímulo inespecífico e na presença da proteína rMan e 5

5.2.1. Marcação intracelular de citocinas

A fim de avaliar se havia diferença na resposta celular inespecífica de indivíduos alérgicos e não alérgicos, as células do grupo alérgico e grupo controle foram estimuladas com PMA e ionomicina, para comparação da produção das citocinas IFN- γ e IL-13 entre os grupos. Embora o grupo alérgico tenha apresentado discreto aumento na produção de IL-13 em relação ao controle, não houve diferença estatística entre os grupos, tanto para citocina com perfil Th1 (IFN- γ) como para citocina do perfil Th2 (IL-13) (Figura 5).

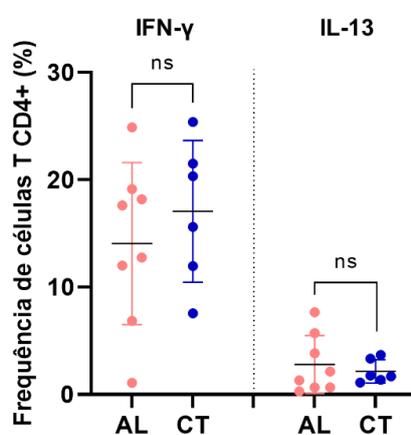


Figura 5. Frequência de células T CD4+ produtoras de IFN- γ e IL-13 após estímulo inespecífico com PMA e ionomicina. As células mononucleares de sangue periférico do grupo alérgico (AL) e grupo controle (CT) foram estimuladas com PMA e ionomicina durante 5 horas em cultura. Em seguida, as células foram marcadas e adquiridas por citometria de fluxo para análise de produção de citocinas. Análise pelo teste de Mann-Whitney.

5.2.2. Detecção de IFN- γ por ELISA

Para detecção de citocinas no sobrenadante de células pelo teste ELISA, foi possível somente analisar a produção de IFN- γ , pois não houve produção de IL-13 suficiente para detecção em ambos os grupos, tanto com estímulo inespecífico (PMA e ionomicina) quanto com estímulo específico de rMan e 5.

Avaliamos se as células estimuladas com estímulo inespecífico (PMA e ionomicina), durante três e seis dias, poderiam influenciar na produção de IFN- γ (Figura 6). Observamos que não houve diferença significativa de produção da citocina entre os grupos em nenhum dos tempos.

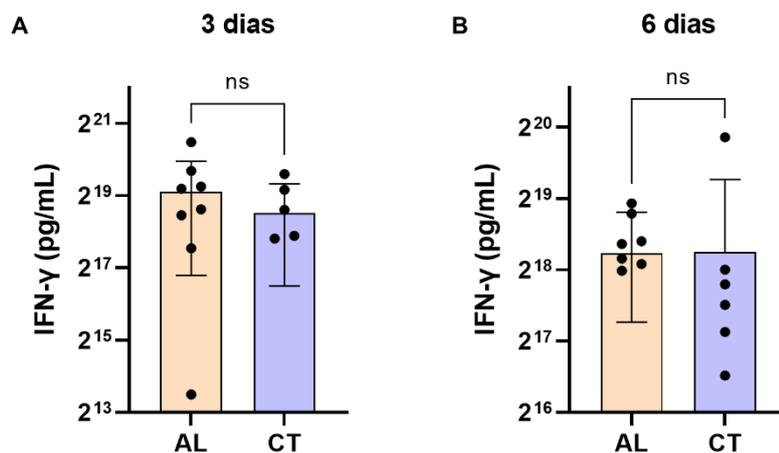


Figura 6. Detecção de IFN- γ em sobrenadante de células após estímulo com PMA e ionomicina. As células mononucleares de sangue periférico do grupo alérgico (AL) e grupo controle (CT) foram estimuladas 48 horas antes do término da cultura celular, nos tempos de 3 e 6 dias. O sobrenadante foi coletado para detecção de IFN- γ por ELISA. Não houve diferença significativa entre os grupos. Análise pelo teste de Mann-Whitney.

Foi realizada uma análise para avaliar a produção de IFN- γ no sobrenadante das células estimuladas com rMan e 5 em dois tempos diferentes de cultura, 3 dias (figura 7A) e 6 dias (figura 7B), em duas concentrações 10 μ g/mL e 50 μ g/mL. Em relação a concentração de rMan e 5 utilizada em cultura celular, podemos observar que houve maior produção de IFN- γ no grupo alérgico, quando estimulado com 50 μ g/mL de rMan e 5 no tempo de 3 dias. Embora não tenha apresentado diferença estatística, é possível observar que no grupo controle, tanto com 3 e 6 dias de estímulo, a produção de IFN- γ é dose-dependente em relação a quantidade da proteína utilizada, havendo maior produção de IFN- γ com 10 μ g/mL de rMan e 5, enquanto no grupo alérgico ocorre o inverso, havendo maior produção de IFN- γ com 50 μ g/mL de rMan e 5. O tempo de estímulo não afetou os resultados, tanto no grupo alérgico como no grupo controle (Figura 8).

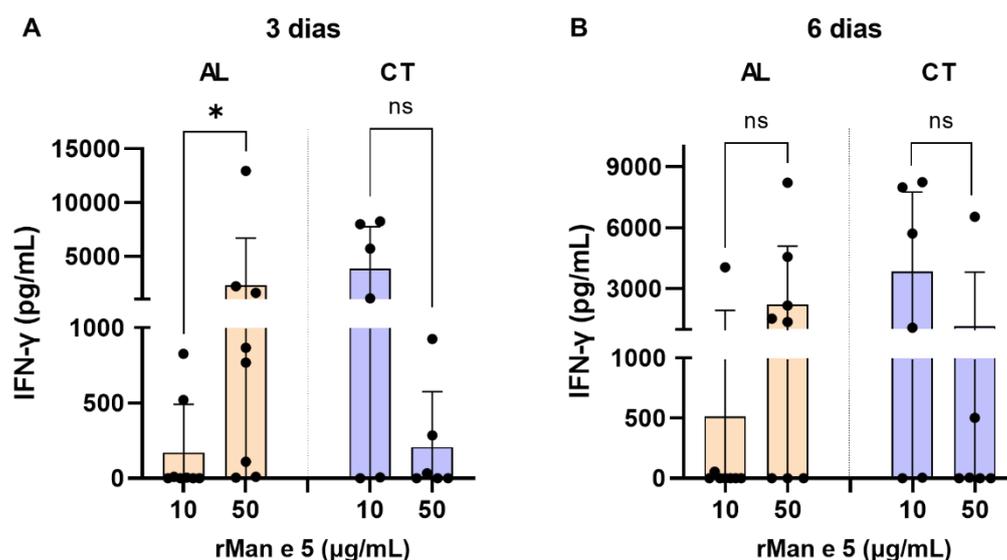


Figura 7. Análise da produção de IFN- γ em sobrenadante de células após estímulo com Man e 5 recombinante em diferentes concentrações. As células mononucleares de sangue periférico do grupo alérgico (AL) e grupo controle (CT) foram estimuladas com 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da proteína Man e 5 recombinante (rMan e 5) durante 3 e 6 dias. Após cada período o sobrenadante foi coletado para detecção de IFN- γ por ELISA. No gráfico A, podemos observar que houve maior produção de IFN- γ no grupo alérgico, quando estimulado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de rMan e 5 no tempo de 3 dias. Análise pelo teste de Mann-Whitney. *: $p < 0,05$.

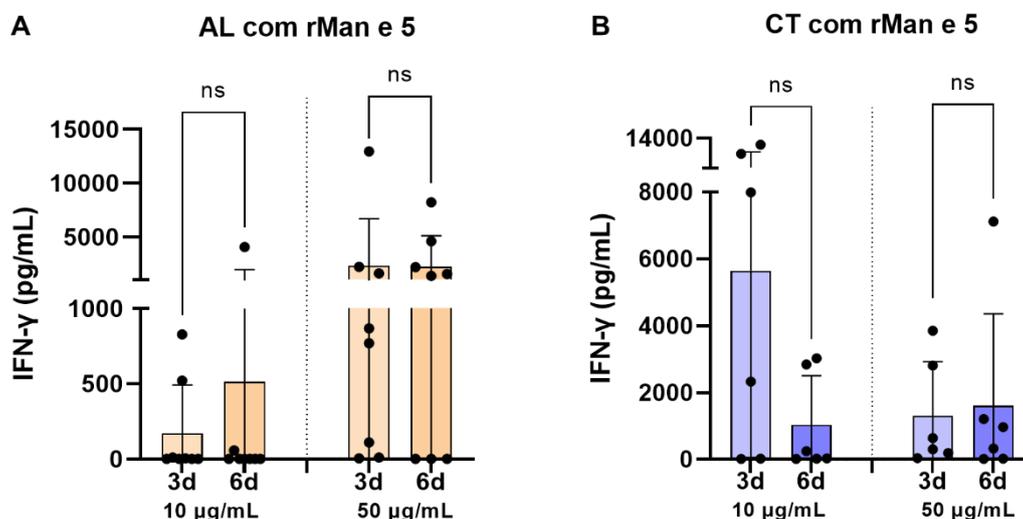


Figura 8. Análise da produção de IFN- γ em diferentes tempos de cultura. As células mononucleares de sangue periférico do grupo alérgico (AL) e grupo controle (CT) foram estimuladas com 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da proteína Man e 5 recombinante (rMan e 5) durante 3 (3d) e 6 dias (6d). Após cada período o sobrenadante foi coletado para detecção de IFN- γ por ELISA. Não foi observada diferença estatística significativa entre os diferentes tempos de cultura. Análise pelo teste de Mann-Whitney.

Ainda em relação as células estimuladas com rMan e 5, ao compararmos os grupos podemos observar que houve maior produção de IFN- γ no grupo controle em relação ao grupo alérgico, quando estimulado com 10 $\mu\text{g/mL}$ de rMan e 5 durante o tempo de 6 dias (Figura 9B). Curiosamente, mesmo sem diferença estatística, o grupo alérgico produziu mais IFN- γ em relação ao grupo controle, com 50 $\mu\text{g/mL}$ de rMan e 5, nos dois tempos.

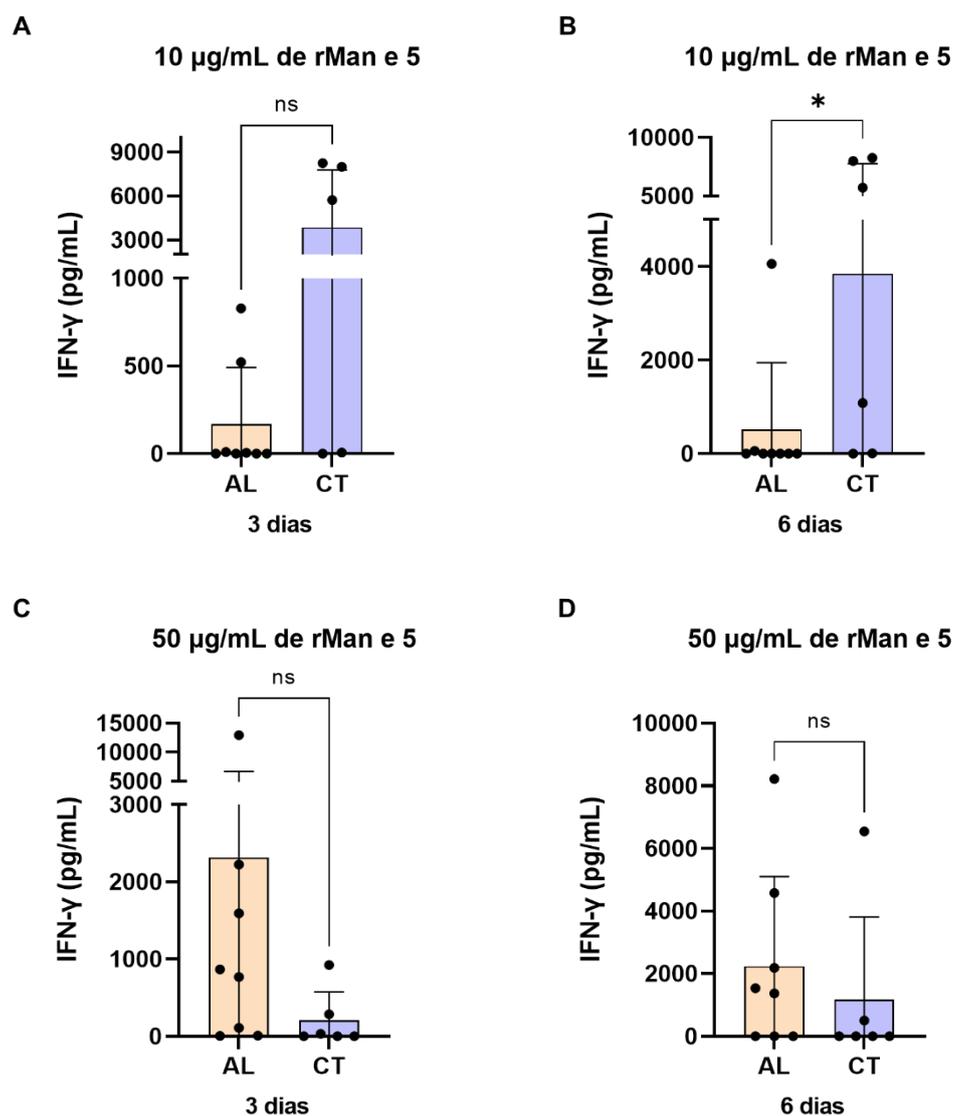


Figura 9. Comparação da produção de IFN- γ entre grupo alérgico e grupo controle. As células mononucleares de sangue periférico do grupo alérgico (AL) e grupo controle (CT) foram estimuladas com 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da proteína Man e 5 recombinante (rMan e 5) durante 3 e 6 dias. Após cada período o sobrenadante foi coletado para detecção de IFN- γ por ELISA. No gráfico B podemos observar que houve maior produção de IFN- γ no grupo controle em relação ao grupo alérgico. Análise pelo teste de Mann-Whitney. *: $p < 0,03$.

5.2.3. Expressão gênica de IFN- γ , IL-10 e IL-13

Para avaliação da expressão genica por qPCR, foi possível realizar os ensaios com apenas seis indivíduos do grupo alérgico (indivíduos 1, 2, 4, 5, 6 e 8) e quatro indivíduos do grupo controle (indivíduos 9, 11, 12 e 13) devido a quantidade e qualidade de RNA extraído dos demais indivíduos, que foi insuficiente e não houve possibilidade de repetição do ensaio pela quantidade limitada de células. Embora as células de todos os indivíduos tenham sido estimuladas com a proteína rMan e 5 em diferentes concentrações e tempos, não foi possível realizar a qPCR novamente devido a quantidade e qualidade do RNA extraído, que foi insuficiente para prosseguir com o restante do ensaio. Além disso, a quantidade de reagentes necessária para analisar todas as condições de cultura, em triplicata e para todas as citocinas planejadas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IFN- γ), seria muito alta. Levando em conta todos esses fatores, optamos por analisar as células estimuladas com PMA e ionomicina e avaliar a expressão gênica apenas de IFN- γ , IL-10 e IL-13.

Após estímulo com PMA e ionomicina podemos observar que não houve diferença estatística entre os grupos, para nenhuma das citocinas avaliadas (Figura 10).

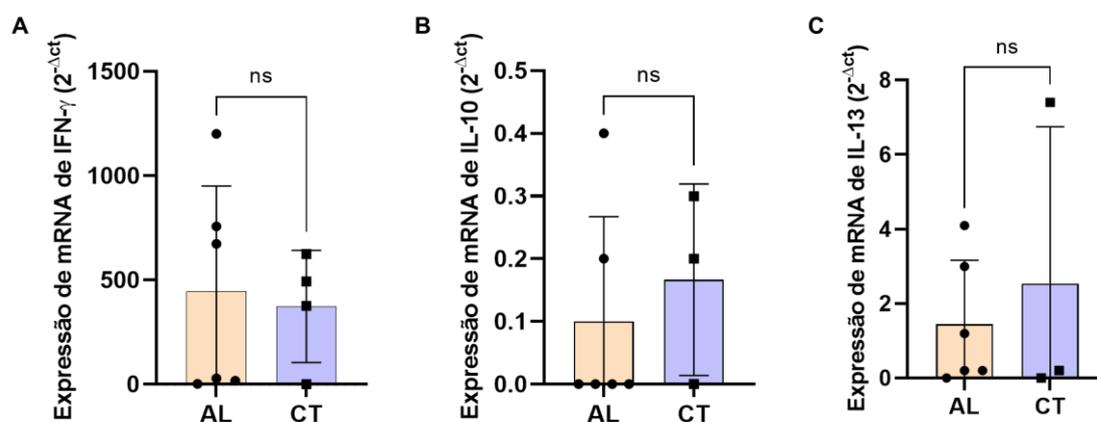


Figura 10. Expressão gênica de citocina do perfil Th1 (IFN- γ) e citocinas do perfil Th2 (IL-10 e IL-13). As células mononucleares de sangue periférico do grupo alérgico (AL) e grupo controle (CT) foram estimuladas com PMA e ionomicina durante 48 horas em cultura. O RNA total foi extraído e a expressão gênica das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-13 foi determinada por qPCR. Não foi observada diferença significativa entre os grupos. Análise pelo teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo produzimos de forma recombinante um dos alérgenos descritos para mandioca, a proteína Man e 5. A produção desta proteína foi realizada utilizando um sistema de transfecção de plasmídeo em células Expi293, linhagem derivada de células HEK293, provenientes do rim de embrião humano. A produção de alérgenos e outras proteínas recombinantes por esse sistema de transfecção já é bem estabelecida^{65,66,67}, dado a versatilidade das células HEK para reprodução, manutenção, alta eficiência de transfecção e produção de alto rendimento proteico^{68,69}. Embora o sistema de transfecção e produção de proteínas utilizando a bactéria *Escherichia coli* seja o modelo mais utilizado⁷⁰, optamos por um método de produção sem o risco da presença de endotoxinas, provenientes da bactéria, que poderiam interferir com os experimentos feitos com a proteína produzida.

A proteína Man e 5 possui uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa em gel SDS-PAGE^{57,64}, porém a proteína rMan e 5 produzida apresentou massa molecular de aproximadamente 37 kDa, sendo um pouco maior do que o esperado. Essa diferença pode ser explicada porque a sequência da proteína produzida foi maior que a sequência original encontrada no banco de dados Uniprot, uma vez que foi incorporada uma cauda de histidina para posterior purificação da proteína. As proteínas com massa molecular superior a 37 kDa que podem ser observadas na Figura 4A, se devem pela presença da grande quantidade de lisado celular, mesmo após o processo de purificação da proteína. Outra possibilidade é a formação de dímeros da proteína, resultando em múltiplas bandas com massa molecular maior que o esperado. Essa dimerização pode ter ocorrido espontaneamente ou por fatores externos, como aglomeração macromolecular (grande quantidade de proteína para pouco solvente), fosforilação, variações na força iônica e mudanças de pH ou temperatura⁷¹. Vale a pena frisar que devido a dificuldade na produção da proteína, a etapa de polimento após purificação da mesma não foi feita, fase que consiste em retirar o máximo de resíduos celulares e isolar a proteína através de cromatografia líquida de alta eficiência, com colunas específicas considerando as características físico/químicas da proteína. Embora a produção da proteína não tenha tido alto grau de pureza, podemos inferir que seja rMan e 5 devido à forte reatividade de IgE do grupo alérgico observada no WB, na região de massa molecular esperada da proteína.

A presença de reatividade IgE a uma proteína na região entre 64 e 82 kDa no grupo alérgico e controle pode ser justificada pelo fato de que anticorpos IgEs podem ligar-se de forma não específica a proteínas presentes em abundância excessiva, resultando em reatividades não específicas⁷².

Este estudo visou investigar a diferença da resposta imune celular entre um grupo alérgico a mandioca e um grupo controle sem AA. Após incubação com estímulos inespecíficos (PMA e ionomicina) e estímulo específico com o alérgeno rMan e 5, analisou-se a produção de citocinas do perfil Th1 e Th2. A hipersensibilidade IgE mediada é caracterizada pela secreção de citocinas de perfil tipo 2, incluindo IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que são secretadas a partir de células T CD4+⁷³. Embora não tenha sido possível observar diferença em relação a produção dessas citocinas nos grupos avaliados, muito provavelmente porque a coorte possui poucos indivíduos, podemos sugerir que com um número maior de indivíduos seria possível visualizar alguma diferença significativa na produção de IL-13, citocina que aumenta a expressão de MHC classe II, regula a contração das células do músculo liso e promove a produção de muco no epitélio das vias aéreas, tendo um importante papel no desenvolvimento de doenças alérgicas⁷⁴. Esta interleucina é homóloga à IL-4 e compartilha muitas de suas atividades biológicas em células fagocíticas mononucleares, células endoteliais, células epiteliais e células B. Em células B, a IL-13 é responsável por promover a mudança de classe para IgE, e em células endoteliais induz a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), aumentando a adesão de células T, eosinófilos e basófilos no endotélio⁷³. A IL-13 é secretada predominantemente por células Th2, mas também por outras células, como ILC2, mastócitos e basófilos⁷⁵.

Altos níveis de IL-13 já foram encontrados em eosinófilos do sangue periférico de indivíduos com asma brônquica e dermatite atópica⁷⁴. Ando *et al.* (2017) mostraram que o bloqueio do fator liberador de histamina, que desempenha a função de estimular a liberação de histamina, IL-4 e IL-13 de mastócitos e basófilos, melhora os sintomas de AA em modelo animal, além de estar associado à melhora clínica em pacientes alérgicos ao ovo que foram submetidos a OIT⁷⁶. Estudos que identificaram células T CD4+ alérgico específicas de indivíduos alérgicos a amendoim ou ovo, constataram a produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 após apenas 4-6 horas de estimulação com seus respectivos extratos^{77,78}.

As IL-4 e IL-13 podem ser um alvo terapêutico na AA devido seu receptor em comum, IL-4R α , que possui afinidade pelo monoclonal dupilumabe, medicamento que desempenha a função de inibir várias vias imunológicas dependentes de Th2, incluindo a via de sinalização para mudança de classe IgE, polarização de macrófagos para um fenótipo pró-inflamatório e a eosinofilia periférica. Este medicamento já é utilizado em dermatite atópica, asma e polipose nasal. Estudos para o tratamento de AA com esse monoclonal estão em andamento⁷⁹.

A produção de IL-10 entre os grupos experimentais deste estudo também não apresentou diferenças estatísticas significativas, porém pode-se observar um aumento sutil na expressão gênica de IL-10 no grupo controle. Sabe-se que esta citocina imunoreguladora, produzida por células Th1 e Th2, macrófagos, monócitos, DCs, mastócitos, células epiteliais e células Treg, possui um papel crítico na propagação e supressão das respostas imunes⁸⁰, sendo assim podemos levantar a hipótese que com um número maior poderíamos observar diferenças significativas na produção de IL-10 entre os grupos. Nas doenças alérgicas essa citocina possui a capacidade de diminuir a síntese da IgE alérgica específica e a sobrevivência de eosinófilos. Um fato curioso é que apicultores, que sofrem múltiplas picadas de abelha e são naturalmente tolerantes a seu veneno, apresentam altos níveis de IL-10⁷³. Também já foi descrito que a IL-10 modula o desenvolvimento de AA, promovendo a expansão de mastócitos na mucosa⁸¹. Essas observações sugerem que a IL-10 pode modular o resultado da resposta alérgica.

O IFN- γ é uma citocina com múltiplas funções, incluindo funções antivirais, antitumorais e imunomoduladoras. Os efeitos do IFN- γ nas doenças alérgicas são mediados por vários mecanismos, como regulação da apresentação do alérgeno aos linfócitos T, diferenciação de células T CD4+ imaturas para fenótipo Th1 e/ou inibição na diferenciação de células Th2, supressão da liberação de citocinas do perfil Th2, inibição do recrutamento de células efetoras para o local da inflamação, apoptose em eosinófilos e bloqueio da troca de classe para IgE em células B, além de induzir produção de IgG⁸². Nossos resultados demonstraram maior produção de IFN- γ no grupo controle em relação ao grupo alérgico. Sabemos que a regulação da resposta imune com IFN- γ induz a tolerância em indivíduos com AA. Essa importante citocina já foi utilizada para tratar indivíduos com APLV através de OIT, induzindo tolerância ao alimento⁸³, dados que corroboram com o estudo de Noh *et al.* (2009), onde indivíduos

com APLV, alergia ao ovo de galinha e ao trigo desenvolveram tolerância aos alimentos alergênicos através da OIT com IFN- γ ⁸⁴.

A presença de IFN- γ no contexto da alergia está relacionada a um perfil de tolerância, então, o esperado seria que a produção de IFN- γ fosse maior no grupo controle, independentemente da quantidade ou duração do estímulo. Interessantemente, em nosso estudo observamos maior produção de IFN- γ no grupo alérgico com a maior concentração de rMan e 5 (50 $\mu\text{g/mL}$), consistente com o trabalho de Gardner *et al.* (2004), que avaliaram a produção de IFN- γ em células de indivíduos alérgicos estimuladas com extrato total de ácaro, comparando duas concentrações do extrato e constatando que a maior concentração de estímulo induzia maior produção de IFN- γ ⁸⁵. Esses dados sugerem que altas doses de um alérgeno são necessárias para induzir produção de IFN- γ em indivíduos alérgicos, podendo ser um fator importante para conduta de imunoterapia específica. Entretanto, esta citocina também já foi implicada na asma grave, contribuindo para a patologia da doença⁸⁶ e em um estudo recente, Link *et al.* (2022) demonstraram que o IFN- γ promove a ativação de mastócitos, induzindo anafilaxia em ratos sensibilizados, sugerindo que, embora o IFN- γ tenha a capacidade de prevenir o desenvolvimento de AA, também possui a capacidade de exacerbar uma AA já estabelecida⁸⁷.

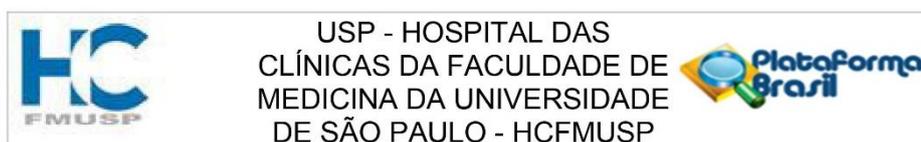
Embora não tenha sido observado o perfil de citocinas esperado nos grupos, pelo número pequeno de indivíduos, neste estudo constatamos maior produção de IFN- γ no grupo controle em relação ao grupo alérgico, e que indivíduos alérgicos produzem mais IFN- γ frente maior concentração do alérgeno, podendo isso ser favorável para conduta terapêutica ou tendo alguma implicação na AA já estabelecida. Portanto, o papel do IFN- γ e sua relação com a AA precisa ser melhor elucidado.

7. CONCLUSÃO

O alérgeno Man e 5 foi produzido e reconhecido pela IgE de indivíduos alérgicos à mandioca. A molécula foi capaz de estimular a produção de citocinas de perfil Th2 (IL-13), mas também de perfil Th1 e regulador (IFN- γ). Entretanto o número de indivíduos testados não foi suficiente para mostrar diferenças estatísticas das citocinas entre o grupo alérgico e controle, com exceção da citocina IFN- γ , que apresentou maior produção no grupo controle, dado concordante com a literatura devido seu importante papel no cenário de tolerância imunológica. Entretanto, mais estudos com uma coorte maior são necessários para elucidar melhor a resposta celular na alergia à mandioca e a relação do IFN- γ com outras citocinas nesse contexto.

8. ANEXOS

ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMUSP (CAAE: 30801420.7.0000.0068, parecer número 4.975.492)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Keity Souza Santos

Área Temática:

Versão: 2

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: 4.975.492

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores solicitam uma emenda ao Projeto aprovado "Identificação e caracterização dos alérgenos da mandioca, onde será avaliada a reatividade cruzada com frutas diversas em indivíduos alérgicos a mandioca. Trata-se da inclusão da aluna de mestrado Safiri de Paiva Alves e de um novo grupo de amostras de sangue de indivíduos não alérgicos e que não sejam profissionais da saúde para constituir o grupo controle. A emenda é pertinente ao projeto e o grupo controle de grande importância para validação dos resultados da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

A emenda solicitada não altera os objetivos do projeto pré-aprovado e a inclusão do novo grupo é pertinente ao desenvolvimento do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A emenda não altera os riscos do sujeito da pesquisa.

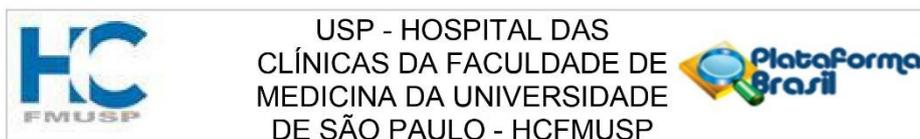
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A inclusão do grupo controle é de grande importância para análise dos resultados e tratamento estatístico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado para o desenvolvimento do estudo.

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: 4.975.492

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1825204_E1.pdf	13/09/2021 14:55:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmandsafiri.docx	13/09/2021 14:54:51	Keity Souza Santos	Aceito
Outros	Carta_CEP_E1_mandioca.docx	13/09/2021 14:54:22	Keity Souza Santos	Aceito
Outros	TermoDadosDeRegistroEletronico_assinado.pdf	14/04/2020 16:47:17	Keity Souza Santos	Aceito
Outros	Autorizacao_Departamento_Keity.pdf	13/04/2020 15:01:46	ANNE KAROLINE ROCHA MEDRADO VENTURA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CartaFabio_Autorizacao_Keity_Mandioca.pdf	13/04/2020 15:00:30	ANNE KAROLINE ROCHA MEDRADO VENTURA	Aceito
Folha de Rosto	FR_KEITYSOUZASANTOS_12970_OK.pdf	13/04/2020 14:57:47	ANNE KAROLINE ROCHA MEDRADO VENTURA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mandioca_Anne_Ventura_FINAL.pdf	25/03/2020 14:32:03	ANNE KAROLINE ROCHA MEDRADO VENTURA	Aceito
Cronograma	Cronograma_Anne_Ventura.pdf	25/03/2020 14:31:15	ANNE KAROLINE ROCHA MEDRADO VENTURA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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: 4.975.492

SAO PAULO, 15 de Setembro de 2021

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. Akdis, Cezmi A., and Ioana Agache, eds. *Global atlas of allergy*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2014.
2. Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, and Shiv Pillai. *Imunologia Celular e Molecular*. 9ª ed. Elsevier, 2019.
3. Doll, R. J., et al. "Epidemiology of allergic diseases." *Allergy and asthma* (2019): 31-51.
4. Wang, Ji, et al. "Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8.1 (2023): 138.
5. Manifesto, Advocacy. "Tackling the allergy crisis in europe-concerted policy action needed." Available at EAACI website: <https://www.eaaci.org/outreach/public-declarations/3243-advocacy-manifesto-tackling-the-allergy-crisis-in-europe-2015.html>. (2015).
6. Warren, Christopher M., Jialing Jiang, and Ruchi S. Gupta. "Epidemiology and burden of food allergy." *Current allergy and asthma reports* 20 (2020): 1-9.
7. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
8. Tham, Elizabeth Huiwen, et al. "Epicutaneous sensitization to food allergens in atopic dermatitis: What do we know?." *Pediatric allergy and immunology* 31.1 (2020): 7-18.
9. Yu, Wong, Deborah M. Hussey Freeland, and Kari C. Nadeau. "Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy." *Nature Reviews Immunology* 16.12 (2016): 751-765.
10. Jutel, Marek, et al. "Nomenclature of allergic diseases and hypersensitivity reactions: Adapted to modern needs: An EAACI position paper." *Allergy* (2023).
11. Brough, Helen A., et al. "Epicutaneous sensitization in the development of food allergy: what is the evidence and how can this be prevented?." *Allergy* 75.9 (2020): 2185-2205.
12. Walker, Jennifer A., and Andrew NJ McKenzie. "TH2 cell development and function." *Nature Reviews Immunology* 18.2 (2018): 121-133.
13. Gowthaman, Uthaman, et al. "T follicular helper cells in IgE-mediated pathologies." *Current Opinion in Immunology* 74 (2022): 133-139.

14. Palomares, Oscar, et al. "Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells." *Immunological reviews* 278.1 (2017): 219-236.
15. O'Hehir, Robyn E., Stephen T. Holgate, and Aziz Sheikh, eds. *Middleton's Allergy Essentials E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2015.
16. Rivas, Magali Noval, and Talal A. Chatila. "Regulatory T cells in allergic diseases." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138.3 (2016): 639-652.
17. Kanagaratham, Cynthia, et al. "IgE and IgG antibodies as regulators of mast cell and basophil functions in food allergy." *Frontiers in immunology* 11 (2020): 3000.
18. Renz, Harald, et al. "Food allergy." *Nature Reviews Disease Primers* 4.1 (2018): 1-20.
19. Tordesillas, Leticia, M. Cecilia Berin, and Hugh A. Sampson. "Immunology of food allergy." *Immunity* 47.1 (2017): 32-50.
20. Seth, Divya, et al. "Food allergy: A review." *Pediatric annals* 49.1 (2020): e50-e58.
21. De Martinis, Massimo, et al. "New perspectives in food allergy." *International journal of molecular sciences* 21.4 (2020): 1474.
22. Renz, Harald, et al. "Food allergy." *Nature reviews Disease primers* 4.1 (2018): 1-20.
23. Anvari, Sara, et al. "IgE-mediated food allergy." *Clinical reviews in allergy & immunology* 57.2 (2019): 244-260.
24. Brasal-Prieto, Mariano, et al. "Update on In Vitro Diagnostic Tools and Treatments for Food Allergies." *Nutrients* 15.17 (2023): 3744.
25. Connors, Lori, et al. "Non-IgE-mediated food hypersensitivity." *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 14.2 (2018): 1-9.
26. Burks, A. Wesley, et al. "ICON: food allergy." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129.4 (2012): 906-920.
27. Popescu, Florin-Dan. "Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens." *World journal of methodology* 5.2 (2015): 31.
28. Jackson, Kristen D., LaJeana D. Howie, and Omolara Jean Akinbami. *Trends in allergic conditions among children: United States, 1997-2011*. No. 121. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, 2013.
29. Jones, Stacie M., and A. Wesley Burks. "Food allergy." *New England Journal of Medicine* 377.12 (2017): 1168-1176.

30. De Martinis, Massimo, et al. "New perspectives in food allergy." *International journal of molecular sciences* 21.4 (2020): 1474.
31. Turner, Paul J., and Dianne E. Campbell. "Epidemiology of severe anaphylaxis: can we use population-based data to understand anaphylaxis?." *Current opinion in allergy and clinical immunology* 16.5 (2016): 441.
32. Prescott, Susan L., et al. "A global survey of changing patterns of food allergy burden in children." *World Allergy Organization Journal* 6.1 (2013): 1-12.
33. Sampath, Vanitha, et al. "Food allergy across the globe." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 148.6 (2021): 1347-1364.
34. Solé, Dirceu, et al. "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." *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia* 2.1 (2018): 7-38.
35. Osborne, Nicholas J., et al. "Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127.3 (2011): 668-676.
36. Dunlop, Joan H., and Corinne A. Keet. "Epidemiology of food allergy." *Immunology and Allergy Clinics* 38.1 (2018): 13-25
37. Osterballe, M., et al. "The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults." *Pediatric Allergy and Immunology* 16.7 (2005): 567-573.
38. Sánchez, J., and A. Sánchez. "Epidemiology of food allergy in Latin America." *Allergologia et immunopathologia* 43.2 (2015): 185-195.
39. Naspitiz, Charles K., et al. "Sensitization to inhalant and food allergens in Brazilian atopic children by in vitro total and specific IgE assay: Allergy Project-PROAL." *Jornal de Pediatria* 80 (2004): 203-210.
40. Tassi, Roberta OS, et al. "Perfil de sensibilização a aeroalérgenos e alimentos em pacientes com dermatite atópica do HSPE-SP." *Rev. bras. alergia imunopatol* (2007): 101-106.
41. Gonçalves, L. C. P., et al. "Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil." *Allergologia et immunopathologia* 44.6 (2016): 497-503.
42. Frati, F et al. "The skin prick test." *Journal of biological regulators and homeostatic agents* vol. 32,1 Suppl. 1 (2018): 19-24.

43. Ansotegui, Ignacio J., et al. "IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper." *World allergy organization journal* 13.2 (2020): 100080.
44. Oriel, Roxanne Carbonell, and Julie Wang. "Diagnosis and management of food allergy." *Immunology and Allergy Clinics* 41.4 (2021): 571-585.
45. Fujita, Hiroyuki, et al. "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *Clinical and translational allergy* 2.1 (2012): 1-8.
46. Cavkaytar, Ozlem, Cezmi A. Akdis, and Mübeccel Akdis. "Modulation of immune responses by immunotherapy in allergic diseases." *Current Opinion in Pharmacology* 17 (2014): 30-37.
47. Jutel, Marek, et al. "International consensus on allergy immunotherapy." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136.3 (2015): 556-568.
48. US Food and Drug Administration. "FDA approves first drug for treatment of peanut allergy for children. 2020." (2020).
49. Okezie, B. Onuma, Frank V. Kosikowski, and Pericles Markakis. "Cassava as a food." *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 17.3 (1983): 259-275.
50. Howeler, Reinhardt, NeBambi Lutaladio, and Graeme Thomas. *Save and grow: cassava. A guide to sustainable production intensification*. Fao, 2013.
51. Zhu, Fan. "Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch." *Carbohydrate polymers* 122 (2015): 456-480.
52. Gaspar, A., et al. "Anaphylactic reaction to manioc: cross-reactivity to latex." *Allergy* (2003): 683-684.
53. Galvao, C. E. S., et al. "Latex allergy and cross-reactivity to manioc: report of 2 cases." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113.2 (2004): S61.
54. Ibero, M., M. J. Castillo, and F. Pineda. "Allergy to cassava: a new allergenic food with cross-reactivity to latex." *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 17.6 (2007): 409.
55. Antolin-Amerigo, D., et al. "Hypersensitivity to cassava: an allergen-based assessment." *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 22.5 (2012): 385-386.
56. Deschampheleire, M. "Food allergy to cassava without latex sensitization." *Allergy*. Vol. 74. 111 River St, Hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley, 2019.

57. Santos, Keity Souza, et al. "Novel allergens from ancient foods: Man e 5 from manioc (*Manihot esculenta* Crantz) cross reacts with Hev b 5 from latex." *Molecular Nutrition & Food Research* 57.6 (2013): 1100-1109.
58. Ventura, Anne KRM, et al. "Fructose biphosphate aldolase: A new cassava allergen." *World Allergy Organization Journal* 16.12 (2023): 100845.
59. Pomés, Anna, et al. "IgE and T Cell reactivity to a comprehensive panel of cockroach allergens in relation to disease." *Frontiers in immunology* 11 (2021): 621700.
60. Dillon, Myles BC, et al. "Different Bla-g T cell antigens dominate responses in asthma versus rhinitis subjects." *Clinical & Experimental Allergy* 45.12 (2015): 1856-1867.
61. ThermoFisher Scientific; Expi293™ Expression System: Structural Biology and Inducible Expression Modules, USER GUIDE. 2020.
62. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25(9):1327-33.
63. Ai, Wenchao, et al. "Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment." *International journal of environmental research and public health* 10.9 (2013): 3834-3842.
64. Man e 5 Allergen - Allergen Nomenclature WHO/IUIS. Disponível em <<https://allergen.org/viewallergen.php?aid=726>>. Acesso em 18 jun. 2023.
65. Major pollen allergen Art v 1 Protein, *Artemisia vulgaris*, Recombinant. SinoBiological. Disponível em <<https://www.sinobiological.com/recombinant-proteins/artemisia-vulgaris-major-pollen-allergen-art-v-1-69035-a08h>>. Acesso em 18 jun. 2023.
66. Pollen allergen Phl p 2 Protein, *Phleum pratense*, Recombinant. SinoBiological. Disponível em <<https://www.sinobiological.com/recombinant-proteins/phleum-pratense-phlpii-69047-a07h>>. Acesso em 18 jun. 2023.
67. Chin, Christine Lin, et al. "A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin." *Scientific Reports* 9.1 (2019): 1-16.

68. Tan, Evan, et al. "HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 9 (2021): 796991.
69. Thomas, Philip, and Trevor G. Smart. "HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins." *Journal of pharmacological and toxicological methods* 51.3 (2005): 187-200.
70. Liu, Changqi, LeAnna N. Willison, and Shridhar K. Sathe. "Recombinant allergen production in E. coli." *Food Allergens: Methods and Protocols* (2017): 23-45.
71. Gotte, Giovanni, and Marta Menegazzi. "Protein oligomerization." *International Journal of Molecular Sciences* 24.13 (2023): 10648.
72. Multiple Bands Troubleshooting in Western Blots. SinoBiological. Disponível em <<https://www.sinobiological.com/category/wb-troubleshooting-multiple-bands>>. Acesso em 18 jun. 2023.
73. Kubo, Terufumi, et al. "Introduction to mechanisms of allergic diseases." *Middleton's allergy essentials*. Elsevier, 2017. 1-27.
74. Lacy, Paige. "Eosinophil cytokines in allergy." *Cytokine Effector Functions in Tissues*. Academic Press, 2017. 173-218.
75. Napolitano, Maddalena, et al. "The hidden sentinel of the skin: An overview on the role of interleukin-13 in atopic dermatitis." *Frontiers in Medicine* 10 (2023): 1165098.
76. Ando, Tomoaki, et al. "Histamine-releasing factor enhances food allergy." *The Journal of clinical investigation* 127.12 (2017): 4541-4553.
77. Chiang, David, et al. "Single-cell profiling of peanut-responsive T cells in patients with peanut allergy reveals heterogeneous effector TH2 subsets." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141.6 (2018): 2107-2120.
78. Berin, M. Cecilia, et al. "Egg-specific IgE and basophil activation but not egg-specific T-cell counts correlate with phenotypes of clinical egg allergy." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 142.1 (2018): 149-158.
79. Fiocchi, Alessandro, Brian P. Vickery, and Robert A. Wood. "The use of biologics in food allergy." *Clinical & Experimental Allergy* 51.8 (2021): 1006-1018.
80. Nedelkopoulou, Natalia, et al. "Interleukin 10: the critical role of a pleiotropic cytokine in food allergy." *Allergologia et Immunopathologia* 48.4 (2020): 401-408.

81. IL-10 Enhances IgE-Mediated Mast Cell Responses and Is Essential for the Development of Experimental Food Allergy in IL-10-Deficient Mice.
82. Teixeira, Leonardo K., et al. "The role of interferon-gamma on immune and allergic responses." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 (2005): 137-144.
83. Noh G, Lee SS. 2003. Effects of IFN- γ on milk-specific oral tolerance induction for milk allergy in atopic dermatitis: Food-specific oral tolerance induction using IFN- γ as adjuvant. In: Gianni Marone, ed. *Clinical Immunology and Allergy in Medicine*. Naples: JGC Editions. p 475–496.
84. Noh, Geunwoong, and Sang-Sun Lee. "A Pilot Study of Interferon- γ -Induced Specific Oral Tolerance Induction (ISOTI) for Immunoglobulin E-Mediated Anaphylactic Food Allergy." *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29.10 (2009): 667-676.
85. Gardner, Leanne Margaret, et al. "Increased allergen concentration enhances IFN- γ production by allergic donor T cells expressing a peripheral tissue trafficking phenotype." *Allergy* 59.12 (2004): 1308-1317.
86. Yu, Mang, et al. "Identification of an IFN- γ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma." *The Journal of clinical investigation* 121.8 (2011): 3133-3143.
87. Link, Christopher WM, et al. "IL-2-Agonist-Induced IFN- γ Exacerbates Systemic Anaphylaxis in Food Allergen-Sensitized Mice." *Frontiers in Immunology* 11 (2020): 596772.

APÊNDICE A: Sequência dos primers desenhados para avaliação da expressão de genes imunológicos

Tabela 3. Sequência dos primers desenhados para avaliação da expressão de genes imunológicos. Disponível na base de dados GenBank (<https://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Gene	<i>Foward primer (5'-3')</i>	<i>Reverse primer (5'-3')</i>	Referência NCBI
IL-4	ATGAGAAGGACACTCGCTGC	TGTCGAGCCGTTTCAGGAAT	NM_000589.4 (variante 1) NM_172348.3 (variante 2) NM_001354990.2 (variante 3)
IL-5	TGCTGATAGCCAATGAGACTCTG	TCTTCA GTGCACAGTTGGTG	NM_000879.3
IL-9	ACTGCAGTGCTAATGTGACC	CTCACTGAAGCATGGTCTGGT	NM_000590.2
IL-13	TGCATGTCCGAGACACCAAA	TGAACTGTCCCTCGCGAAAA	NM_002188.3 (variante 1) NM_001354991.2 (variante 2) NM_001354992.2 (variante 3) NM_001354993.2 (variante 4)
IL-10	CAAGACCCAGACATCAAGGC	AAGAAATCGATGACAGCGCC	NM_000572.3 (variante 1) NM_001382624.1 (variante 2)
IFN-Y	GTGTGGAGACCATCAAGGAAGACA	TTGGACATTCAAGTCAGTTACCGAA	NM_000619.3
GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC	CCACATCGCTCAGACACCAT	NM_002046.7 (variante 1) NM_001256799.3 (variante 2) NM_001289745.3 (variante 3) NM_001289746.2 (variante 4)