

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Bromatologia

**Clonagem, expressão recombinante e validação por *microarray* de proteínas  
alimentares potencialmente alergênicas**

GABRIELA JUSTAMANTE HÄNDEL SCHMITZ

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Oliveira do  
Nascimento

São Paulo

2019

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Bromatologia

**Clonagem, expressão recombinante e validação por *microarray* de proteínas  
alimentares potencialmente alergênicas**

GABRIELA JUSTAMANTE HÄNDEL SCHMITZ

**Versão Original**

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Oliveira do  
Nascimento

São Paulo  
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S355c	Schmitz, Gabriela Justamante Händel Clonagem, expressão recombinante e validação por microarray de proteínas alimentares potencialmente alergênicas / Gabriela Justamante Händel Schmitz. - São Paulo, 2019. 137 p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Nascimento, Prof. Dr. Joao Roberto Oliveira do
	1. Alergia alimentar. 2. Expressão recombinante. 3. Microarray. 4. Proteínas alergênicas. I. T. II. Nascimento, Prof. Dr. Joao Roberto Oliveira do, orientador.

GABRIELA JUSTAMANTE HÄNDEL SCHMITZ

Clonagem, expressão recombinante e validação por *microarray* de proteínas  
alimentares potencialmente alergênicas

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

---

Prof. Dr.  
orientador/presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.



*Aos meus pais, Cleide e Walter, pela vida, amor, carinho e dedicação. Por me guiarem sempre, apoiando-me e mostrando-me o caminho do bem e da integridade.*

*Aos meus irmãos, Amanda e Rafael, pelo cuidado e amizade.*

*Ao meu marido e parceiro de vida, Jonathan, pelo companheirismo, respeito, amizade e amor.*

*À nossa filha Lorena, o maior presente de nossas vidas.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento, por sempre me ajudar e confiar em mim. Pelas conversas sinceras e amadurecedoras, fazendo-me enxergar a realidade. Por ter me ensinado tanto, com sua imensa inteligência, durante todo o período de concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabio Morato Castro e Dra. Ariana Yang, pela parceria com o grupo do Ambulatório de Alergia Alimentar do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), e por permitirem que esse trabalho fosse concretizado.

À Profa. Dra. Keity Souza Santos e às suas alunas Karine de Amicis Lima e Daniele Danella Figo, pelo aprendizado proporcionado e por terem permitido a utilização do Laboratório de Alergia e Imunologia da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

Ao meu supervisor na Inglaterra, Prof. Dr. Marcos Alcocer, pela parceria com a *University of Nottingham* (UoN) por meio do grupo de pesquisa em alergia alimentar localizado na *School of Biosciences*, e por me permitir trabalhar em seu laboratório durante um ano, o que me proporcionou muito conhecimento na área.

Ao Prof. Dr. Paddy Tighe da *Faculty of Medicine & Health Sciences*, localizada na *University of Nottingham* (UoN), por permitir a utilização de seus equipamentos e materiais, pela atenção e por me ensinar tanto.

Ao Prof. Carlos Labate e à sua técnica Thaís Cataldi, pela atenção e por permitirem o uso do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, localizado em Piracicaba-SP.

À Profa. Beatriz Rosana Cordenunsi, pela ajuda, amizade e carinho incomensuráveis.

Aos meus amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, principalmente Bruna Lima, Fernanda Peroni, Elias Araujo, Elisa Brasili, Eric Tobaruella, Luciana Tedesco Yoshime e Isabel Massaretto, os quais foram essenciais nessa longa caminhada.

Aos meus amigos da *University of Nottingham*, principalmente Anna Christina Dietz, Marqs Awoniyi, Nanxi Wang, Raquel Madrid, Ronja Pscheid, Rui Wang, Samuel White, Scarlett Holman e Wenyan Zhang, os quais foram meus portos seguros durante o estágio na Inglaterra.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante o período de 09/2014 a 09/2016 (PROCESSO: PROEX 33002010101P0).

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa durante o período de 10/2016 a 01/2019 (PROCESSO: 2016/01308-7).

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) durante o período de 02/2017 a 01/2018 (PROCESSO: 2016/22671-2).

Ao Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) - FAPESP pelo auxílio à pesquisa durante o período da bolsa (PROCESSO: 2013/07914-8).

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – *Food Research Center* (FoRC), pelo auxílio durante o período da bolsa (PROCESSO: 2013/079148).

*“Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugná-la-íamos, se a tivéssemos. O perfeito é desumano, porque o humano é imperfeito”.*

*(Fernando Pessoa)*

## RESUMO

SCHMITZ, G. J. H. **Clonagem, expressão recombinante e validação por *microarray* de proteínas alimentares potencialmente alergênicas**. 2019. 137f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A maioria das respostas alérgicas a alimentos é mediada por IgE, que pode ser detectada para fins de diagnóstico da alergia alimentar. No entanto, para isso é necessário que alérgenos purificados estejam disponíveis para a elaboração dos diferentes formatos de ensaio, inclusive por *microarray*, que se constitui em uma ferramenta bastante útil para análise simultânea, e também para a identificação de reatividade cruzada. A esse respeito, é imprescindível ampliar a plataforma de alérgenos que possam ser empregados para a confecção de *microarrays*. Atualmente, alguns alimentos que constituem objeto de interesse na clínica em função do número de casos de alergia, e sobre os quais as informações a respeito dos alérgenos são escassas, são: abacaxi, mamão, mandioca e manga. Assim, o objetivo desse trabalho foi clonar, expressar e purificar proteínas potencialmente alergênicas de alimentos de importância regional. Após confirmadas por ensaios imunológicos, essas proteínas foram utilizadas na construção e validação de um *microarray* através de ensaios com os soros de pacientes alérgicos aos alimentos selecionados. Para atingir esse objetivo, foram selecionadas proteínas potencialmente alergênicas coincidentes, apontadas tanto pela similaridade com espécies taxonomicamente mais próximas, quanto pela técnica *2D Western Blotting* acoplada à espectrometria de massas. Dezenove proteínas, sendo 4 de abacaxi, 5 de mamão, 6 de mandioca e 4 de manga, foram expressas em *Pichia pastoris*, purificadas e impressas em um *microarray*. Após incubar essas proteínas com os soros dos pacientes alérgicos aos alimentos estudados, 18 proteínas mostraram-se potencialmente alergênicas. Além disso, foi observada reatividade cruzada entre proteínas dos alimentos estudados e também em relação ao látex e outros frutos.

**Palavras-chave:** Alergia alimentar. Expressão recombinante. *Microarray*. Proteínas alergênicas.

## ABSTRACT

SCHMITZ, G. J. H. **Cloning, recombinant expression and validation by microarray of potentially allergenic food proteins.** 2019. 137f. Thesis (PhD in Food Science) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

The majority of allergic reactions to foods is IgE-mediated, which can be detected for the diagnosis of food allergy. However, purified allergens are necessary to produce different kinds of allergy tests, including microarray, which is a useful tool for simultaneous analysis, as well as for the identification of cross-reactivity. In this respect, it is essential to expand the platform of allergens to include them on microarrays. Nowadays, some foods that are object of interest in the clinical area in Brazil and it is necessary a further evaluation about their potential allergens, since there is a limited information about them, are: pineapple, papaya, cassava and mango. Therefore, the aim of this study was cloning, expressing and purifying potentially allergenic proteins of important Brazilian foods. After confirmed by immunological tests, these proteins were used in microarray production and validation by assays with sera from allergic patients to the selected foods. Achieving this goal, matching potentially allergenic proteins were selected, which were identified by comparison among taxonomically closer species (*in silico*) and 2D Western Blotting coupled with Mass Spectrometry. Nineteen proteins: 4 from pineapple, 5 from papaya, 6 from cassava and 4 from mango were expressed in *Pichia pastoris*, purified and printed on a microarray. After incubating those proteins with sera from allergic patients to the selected foods, 18 proteins were detected as potentially allergenic. In addition, cross-reactivity was observed among the proteins from the studied foods, and also regarding to the latex and other fruits.

**Keywords:** Food allergy. Recombinant expression. Microarray. Allergenic proteins.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 Estratégia .....	19
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 Material .....	24
3.1.1 Material vegetal .....	24
3.1.2 Amostras de soros .....	24
3.2 Métodos .....	25
3.2.1 <i>In silico</i> .....	25
3.2.1.1 Levantamento de potenciais alérgenos presentes em alimentos de interesse local através da similaridade taxonômica .....	25
3.2.1.2 Levantamento da ordem e família dos alimentos alergênicos .....	25
3.2.1.3 Levantamento dos alimentos taxonomicamente próximos .....	28
3.2.1.4 Busca dos alérgenos já descritos para os alimentos em estudo e para os taxonomicamente próximos .....	28
3.2.2 <i>2-D Western Blotting</i> .....	28
3.2.2.1 Extração e quantificação de proteínas .....	28
3.2.2.2 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	29
3.2.2.3 Eletroforese bidimensional ( <i>2-D</i> ) .....	30
3.2.2.3.1 Reidratação das tiras de gradiente de pH imobilizado .....	30
3.2.2.3.2 Focalização isoeletrica (IEF) – Primeira dimensão .....	31
3.2.2.3.3 SDS-PAGE – Segunda dimensão .....	31
3.2.2.3.4 Coloração com Azul de Coomassie coloidal .....	32
3.2.2.3.5 Aquisição das imagens dos géis .....	33
3.2.2.4 <i>Western Blotting</i> .....	33
3.2.2.4.1 Transferência de proteínas .....	33
3.2.2.4.2 Coloração das membranas com <i>Deep Purple</i> e aquisição das imagens .....	33
3.2.2.4.3 Bloqueio das membranas e incubação com os soros dos pacientes alérgicos e anticorpo secundário .....	33
3.2.2.4.4 Revelação das membranas e aquisição das imagens .....	34

3.2.2.5 Análise das imagens e excisão dos <i>spots</i> de interesse .....	34
3.2.2.6 Digestão com tripsina .....	35
3.2.2.7 Purificação dos extratos contendo os peptídeos obtidos através da digestão .....	37
3.2.2.8 Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa .....	38
3.2.2.9 Análise dos dados obtidos através da espectrometria de massa ...	39
3.2.3 Expressão recombinante .....	39
3.2.3.1 Transformação de células competentes .....	39
3.2.3.2 Purificação dos plasmídeos .....	40
3.2.3.3 Concentração de DNA e sequenciamento .....	40
3.2.3.4 Linearização do vetor pPICZ A .....	40
3.2.3.5 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> .....	41
3.2.3.6 Expressão em <i>P. pastoris</i> das proteínas potencialmente alergênicas em microplaca .....	42
3.2.3.7 <i>Dot Blot</i> .....	42
3.2.3.8 Expressão dos potenciais alérgenos em <i>Pichia pastoris</i> cultivada em <i>Erlenmeyer</i> .....	43
3.2.3.9 Purificação dos potenciais alérgenos .....	44
3.2.3.10 Determinação da concentração de proteínas purificadas recombinantes .....	45
3.2.3.11 Verificação da qualidade da purificação de proteínas .....	45
3.2.3.12 Confirmação da expressão das proteínas de interesse .....	45
3.2.4 <i>Microarray</i> .....	46
3.2.4.1 Produção do <i>microarray</i> .....	46
3.2.4.1.1 Preparação das lâminas de proteína .....	46
3.2.4.1.2 Hibridização .....	47
3.2.4.1.3 Análise dos dados gerados após a revelação dos biochips .....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1 <i>In silico</i> .....	49
4.1.1 Abacaxi .....	49
4.1.2 Mamão .....	50
4.1.3 Mandioca .....	51
4.1.4 Manga .....	53



<b>4.2 2-D Western Blotting .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.1 Qualidade do extrato proteico .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.2 Seleção dos spots de interesse .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.3 Identificação das proteínas presentes nos spots de interesse .....</b>	<b>61</b>
<b>4.3 Expressão recombinante .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.1 Sequências de genes selecionadas para a expressão em <i>Pichia pastoris</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.2 Confirmação da expressão das proteínas de interesse e seleção dos melhores clones .....</b>	<b>66</b>
<b>4.3.3 Purificação dos potenciais alérgenos .....</b>	<b>68</b>
<b>4.3.4 Avaliação das bandas de proteínas referentes aos potenciais alérgenos .....</b>	<b>73</b>
<b>4.3.5 Determinação da concentração dos potenciais alérgenos .....</b>	<b>77</b>
<b>4.4 Microarray .....</b>	<b>78</b>
<b>4.4.1 Análise da reatividade dos potenciais alérgenos .....</b>	<b>81</b>
<b>4.4.1.1 Abacaxi .....</b>	<b>81</b>
<b>4.4.1.1.1 Enolase 1 .....</b>	<b>81</b>
<b>4.4.1.1.2 Repetição rica em leucina (LRR) .....</b>	<b>83</b>
<b>4.4.1.1.3 Peroxidase .....</b>	<b>85</b>
<b>4.4.1.1.4 Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase C2 (GDPC2) .....</b>	<b>86</b>
<b>4.4.1.2 Mandioca .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4.1.2.1 RmlC-like cupina .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4.1.2.2 Tiorredoxina .....</b>	<b>90</b>
<b>4.4.1.2.3 Glioxalase .....</b>	<b>92</b>
<b>4.4.1.2.4 Alfa/beta Hidrolase .....</b>	<b>92</b>
<b>4.4.1.2.5 Oxidorredutase ligada ao NAD (P) .....</b>	<b>93</b>
<b>4.4.1.2.6 Inibidor de serina protease .....</b>	<b>94</b>
<b>4.4.1.3 Manga .....</b>	<b>96</b>
<b>4.4.1.3.1 Álcool desidrogenase .....</b>	<b>96</b>
<b>4.4.1.3.2 Homocisteína S-metiltransferase .....</b>	<b>97</b>
<b>4.4.1.3.3 Pequena GTP Rab GDI .....</b>	<b>99</b>
<b>4.4.1.3.4 3-cetoacil CoA tiolase B .....</b>	<b>100</b>
<b>4.4.1.4 Mamão .....</b>	<b>101</b>

4.4.1.4.1 Ascorbato peroxidase 2 .....	101
4.4.1.4.2 Germina- <i>like</i> .....	102
4.4.1.4.3 Peroxirredoxina .....	103
4.4.1.4.4 PR .....	105
4.4.1.4.5 Tiorredoxina .....	105
5 DIFICULDADES E CUIDADOS .....	107
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	109
REFERÊNCIAS .....	110
APÊNDICE A – Proteínas identificadas através do <i>2-D Western Blotting</i> ...	114
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	133
ANEXO B – Parecer Consubstanciado do Hospital das Clínicas da FMUSP .....	137

## 1 INTRODUÇÃO

Alergia alimentar é definida como um efeito adverso à saúde, decorrente de uma resposta imunológica específica desencadeada por um alérgeno (antígeno), que ocorre de forma reprodutiva na exposição a um determinado alimento (BOYCE et al., 2010). Geralmente, 5% dos adultos e 8% das crianças são afetados, comprometendo aproximadamente 10% da população ocidental, sendo que oito grupos de alimentos (amendoim, leite, crustáceos, nozes, peixe, soja, trigo e ovo) são responsáveis por cerca de 90% das alergias alimentares (CHAFEN et al., 2010; WINKLE; CHANG, 2014). No entanto, alergias aos vegetais, frutas, sementes e outros grãos também podem existir (DEBROSSE et al., 2011; WINKLE; CHANG, 2014).

Os casos de alergia alimentar têm impacto significativo tanto para os pacientes e suas famílias quanto para o sistema médico, em razão de frequentes visitas aos postos de atendimento médico de emergência e internações devidas à anafilaxia, que pode ser fatal. Os órgãos atingidos são a pele e mucosas, aparelho respiratório, trato gastrintestinal e sistemas cardiovascular e nervoso central (BERND et al., 2006; COLVER et al., 2005; ROSS et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Em alguns grupos de alimentos, como castanhas e frutos do mar, a alergia a um determinado componente do grupo pode implicar em reações aos demais, o que é denominado reatividade cruzada. Isto ocorre devido à similaridade da sequência de aminoácidos entre certas proteínas e ao fato de que os mesmos anticorpos IgE podem reconhecer alérgenos homólogos de espécies diferentes, mas que partilham os mesmos epítomos, que são as regiões que interagem com os anticorpos e que, portanto, são capazes de estimular resposta imunológica. Desse modo, a semelhança entre uma proteína e um alérgeno conhecido pode ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de alergias alimentares, devido à sensibilização inicial ou primária (HOLGATE; CHURCH; LICHTENSTEIN, 2006).

Os alérgenos de alimentos vegetais podem ser classificados em famílias e superfamílias de acordo com sua estrutura e função (BREITENEDER; RADAUER, 2004). Um pequeno e específico grupo de famílias de proteínas presentes nos alimentos é responsável por um grande número de casos de reações alérgicas, já que apenas quatro superfamílias de proteínas (prolaminas, cupinas, profilinas e proteínas relacionadas com a Bet v 1) abrangem aproximadamente 60% dos

alérgenos presentes em alimentos (RADAUER; BREITENEDER, 2007). Porém, além destas, existem outras famílias de alérgenos, como as polcalcinas e expansinas presentes no milho e no arroz, e as proteínas de armazenamento, por exemplo, a patatina presente na batata-inglesa.

A superfamília das prolaminas se destaca em relação ao número de alérgenos, sendo um grupo de proteínas de armazenamento em cereais e em outros membros da família das gramíneas. Essas proteínas são solúveis em misturas hidroalcoólicas e possuem grande quantidade de prolina e glutamina, de onde proveio o nome prolamina (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995). Vale ressaltar que a estrutura desses alérgenos é altamente estável à desnaturação térmica e proteolítica, o que pode contribuir para sua alergenicidade (BREITENEDER; MILLS, 2005). Prolaminas alergênicas incluem as 2S albuminas presentes na castanha do Pará e no gergelim, as *nonspecific lipid transfer proteins* (nsLTPs) do pêssogo e avelã, proteínas inibidoras de tripsina encontradas no arroz e proteína hidrofóbica de soja (BAUD et al., 1993; BREITENEDER; MILLS, 2005; BREITENEDER; RADAUER, 2004; RADAUER; BREITENEDER, 2007; PASTORELLO et al., 2001).

As cupinas possuem este nome devido a uma estrutura comum a elas, descrita como *6-stranded  $\beta$ -barrel*. Em latim, cupa significa barrel, barril em português (DUNWELL, 1998). As germinas, presentes no milho e na cevada, são altamente termoestáveis e representam uma grande família de cupinas em plantas (WOO et al., 2000). A maioria dos alérgenos da superfamília cupina pertence às vicilinas ou globulinas 7S e às leguminas ou globulinas 11S, que podem ser encontradas, por exemplo, no pistache ou amêndoa (RADAUER; BREITENEDER, 2007).

Profilinas alergênicas são proteínas citossólicas que contém de 12 a 15 kDa e são encontradas exclusivamente em plantas que produzem flores. Devido à grande extensão de regiões conservadas, as profilinas possuem alto grau de reatividade cruzada entre pólenes de mono e dicotiledôneas, alimentos de origem vegetal e *Hevea látex* (RADAUER et al., 2006; RADAUER; BREITENEDER, 2007; VIETHS; SCHEURER; BALLMER-WEBER, 2002).

A alergenicidade referente à superfamília das proteínas relacionadas com o Bet v 1 (Bet v 1-like), alérgeno do pólen da bétula, é restrita à família das *pathogenesis-related proteins 10* (PR-10), que podem ser expressas através da indução por patógenos, hormônios vegetais, ferimentos, estresse salino ou frio. A

reatividade cruzada do Bet v 1 com alérgenos homólogos presentes em alimentos vegetais é responsável pela alergia alimentar associada ao pólen de bétula. Alérgenos de pólen relacionados à Bet v 1 são exclusivos da ordem Fagales, enquanto que os alérgenos alimentares têm sido descritos em frutas e vegetais das famílias Rosaceae (maçã e frutas com caroço), Apiaceae (aipo e cenoura) e Fabaceae (amendoim e soja) (RADAUER et al., 2006; RADAUER; BREITENEDER, 2007).

A maioria das respostas alérgicas são mediadas por IgE, a qual pode ser detectada através de testes *in vitro*, como o ELISA, ImmunoCap® e *microarrays*, ou através de testes *in vivo*, que podem ser cutâneo (*skin prick test* – SPT) ou de provocação oral (TPO) (CHAFEN et al., 2010).

As proteínas alergênicas purificadas podem ser empregadas no diagnóstico molecular através de tecnologias baseadas na medida de anticorpos IgE que se ligam às proteínas no ensaio. No Brasil, é comercializado o *ImmunoCAP®/ISAC* (*Immuno-Solid Phase Allergen Chip*) (*Thermo Scientific*), uma plataforma *multiplex* de imunoensaio baseado em *microarray* ou *chip* de alérgenos, que é um microarranjo de proteínas em pequenas placas de vidro ou de materiais sintéticos com microperfurações contendo 100-200 µm de diâmetro. Os alérgenos ficam imobilizados no interior dos micro-orifícios e sobre estes é aplicado o soro do paciente para posterior incubação e detecção de IgE, que é realizada através da medida da intensidade de fluorescência resultante da adição de anticorpos anti-IgE com marcação fluorescente (CANONICA et al., 2013; ALLERGY & AUTOIMMUNITY, 2015).

A plataforma atual do *ISAC* permite a detecção simultânea de 112 alérgenos diferentes, naturais ou recombinantes, de 51 origens distintas, utilizando quantidade mínima de alérgenos e soros, permitindo que muitas amostras sejam analisadas (FERRER et al., 2009; PALACÍN et al., 2012). Desta maneira, o teste proporciona a investigação de um universo mais amplo e a aceleração do diagnóstico, já que pode mostrar a presença de sensibilização para alérgenos de reatividade cruzada, permitindo a adoção de medidas preventivas acerca de uma alergia alimentar que o paciente possa ter (CANONICA et al., 2013; ALLERGY & AUTOIMMUNITY, 2015). Portanto, é de grande importância a expansão do número de alérgenos purificados, tanto no diagnóstico quanto no tratamento de alergias, evitando, por exemplo, restrições dietéticas desnecessárias.

O crescente aumento no financiamento de pesquisas relacionadas às alergias alimentares na Europa reflete o grande interesse na identificação de alérgenos ou de proteínas potencialmente alergênicas das mais diversas fontes e na sua obtenção pela tecnologia do DNA recombinante. Porém, no Brasil, ainda há muito a ser feito, pois apesar de os alérgenos clássicos vistos no país serem os mesmos encontrados nos alimentos europeus, é possível que a grande diversidade geográfica e de variedades de alimentos encontradas no Brasil possam induzir diferentes graus de exposição. Além disso, é importante aprimorar a capacidade de diagnóstico de alergia no país frente aos alimentos a que a população local está mais exposta.

Diante desse quadro, a expressão recombinante de alérgenos de fontes alimentares locais é de grande importância, tanto para ampliar o conhecimento da relação estrutura-atividade de alérgenos, uma vez que isto permite compreender os elementos que determinam a interação com a IgE, como para o aprimoramento do diagnóstico de alergias através de *microarrays*, e mesmo do aperfeiçoamento da imunoterapia.

Uma abordagem baseada na alergologia molecular poderia ser aplicada no estudo das proteínas potencialmente alergênicas de alguns alimentos que constituem objeto de interesse na clínica, em função do número de casos apresentados, mas que não cobertos pelo teste diagnóstico *multiplex* comercial. A partir do levantamento desses alimentos e de suas proteínas potencialmente alergênicas, apontadas tanto pela similaridade com espécies taxonomicamente mais próximas quanto pela técnica *2-D Western Blotting (2-D WB)*, poderia ser feita a clonagem, expressão recombinante e purificação, visando a produção de um *microarray* dessas proteínas, o qual poderia ser testado contra soros de pacientes alérgicos.

Essa etapa de validação das proteínas seria duplamente importante, já que de um lado permitiria a confirmação de casos suspeitos de alergia e o uso das proteínas em *microarrays* para diagnóstico, incluindo a descoberta de possível sensibilização por reatividade cruzada e, de outro, poderia também revelar as proteínas não reativas. O estudo dessas últimas, homólogas a alérgenos, mas incapazes de reagir com o soro de indivíduos alérgicos, seria importante para a elucidação da relação estrutura-atividade alergênica, pois ofereceria a oportunidade de verificar as diferenças entre os dois tipos de proteínas, a alergênica e sua homóloga não reativa, e, talvez, identificar as características estruturais que podem

ser determinantes para interação com IgE e, conseqüentemente, responsáveis pelo desencadeamento das reações alérgicas.

Paralelamente a essa abordagem *in silico*, para a prospecção de potenciais alérgenos visando a montagem dos *arrays*, as proteínas presentes nos alimentos de interesse foram testadas contra os soros dos pacientes alérgicos através da técnica *2-D WB* acoplada à espectrometria de massa (MS), sendo esta última empregada para o sequenciamento de proteínas alergênicas reveladas pelo *WB*. Essa etapa foi realizada de forma a ampliar a possibilidade de identificação de potenciais proteínas alergênicas.

Estudos utilizando eletroforese bidimensional (*2-D*) acoplada à MS já foram desenvolvidos com sucesso na identificação de potenciais alérgenos. Como exemplo, um estudo realizado através da técnica citada, utilizando soros de pacientes norte-americanos alérgicos à soja (*Glycine max* L. Merr.), mostrou a identificação de 19 potenciais proteínas alergênicas desse grão (GAGNON et al., 2010). Através da mesma metodologia foi possível identificar isoformas de alérgenos já conhecidos do amendoim, como o Ara h 1, Ara h 2 e Ara h 3/4 (CHASSAIGNE et al., 2009). Mais recentemente, Sousa et al. (2014) identificaram novas proteínas alergênicas do pólen de *Plantago lanceolata*, responsável por alergias respiratórias em países mediterrâneos, utilizando soros de pacientes alérgicos a esse pólen.

Dessa forma, a combinação do *2-D WB* com a análise *in silico* para a identificação de potenciais sequências de alérgenos, proporciona dupla vantagem. De um lado, permite verificar a concordância entre os dados apontados *in silico* e as proteínas reativas com os soros dos pacientes alérgicos aos alimentos de interesse. De outro, abre a possibilidade de identificar proteínas reativas que não haviam sido previstas a partir das comparações por similaridade taxonômica. Desse modo, há a possibilidade de incluir também essas proteínas identificadas pelo *2-D WB* nos *microarrays*, após a obtenção de suas formas recombinantes.

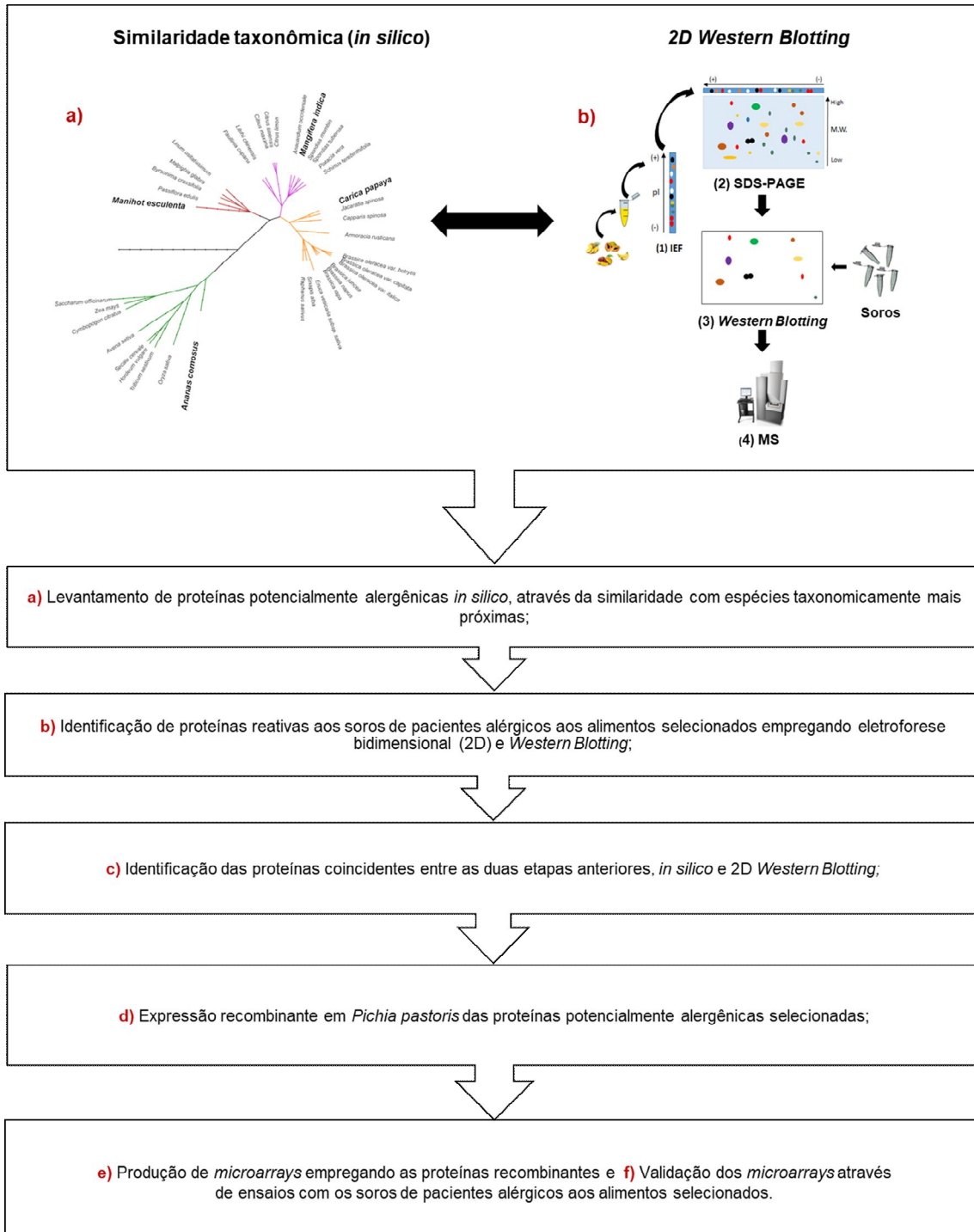
## 1.1 Estratégia

A **Figura 1** representa a estratégia utilizada neste trabalho, indicando que a análise *in silico* e o *2-D WB* são etapas complementares na descoberta de novos alérgenos alimentares. Este trabalho resultou de parceria com o grupo do Ambulatório de Alergia Alimentar do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do

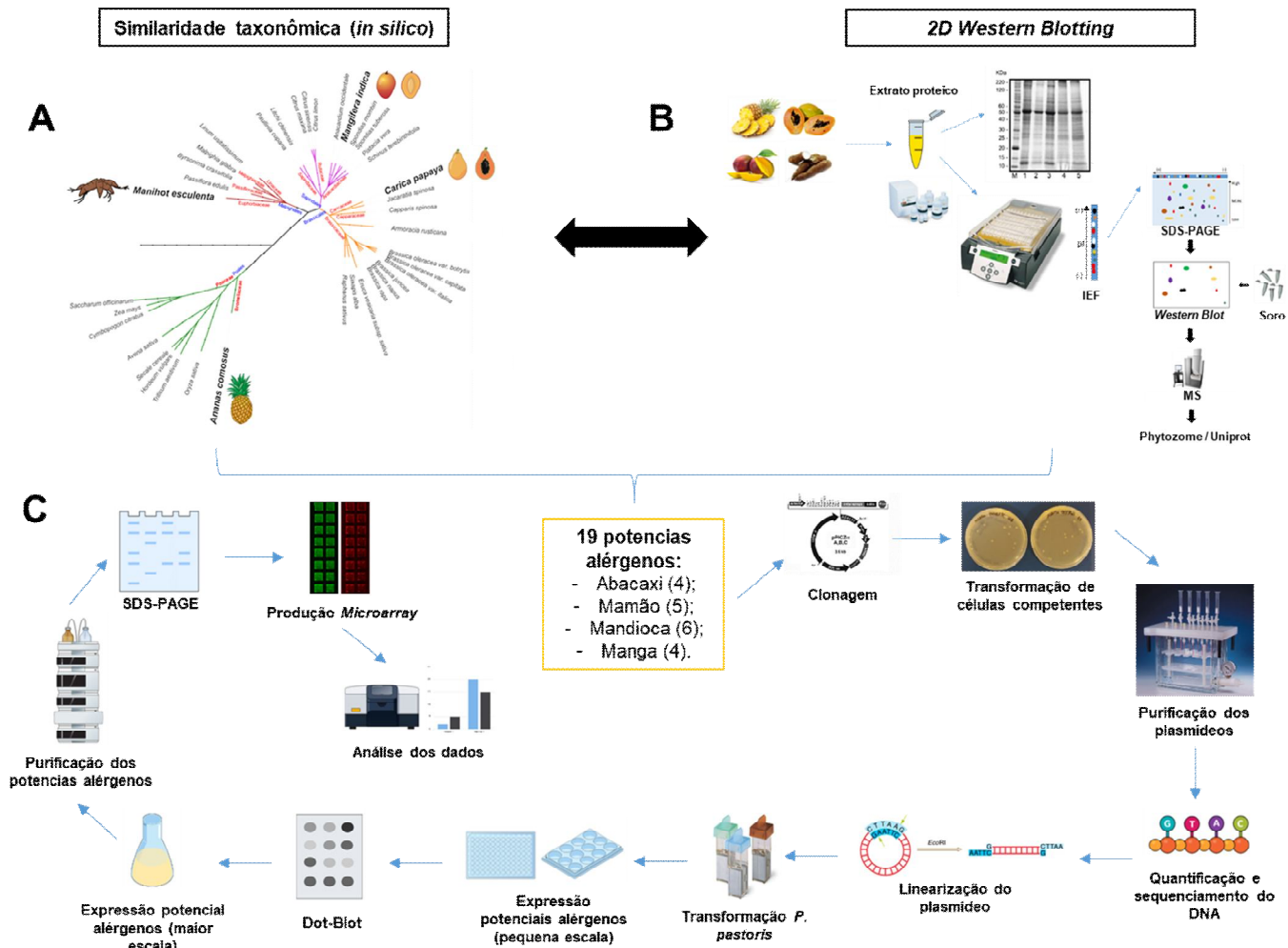
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), liderado pelo Prof. Dr. Fabio Morato Castro e Dra. Ariana Yang, e com a Universidade de Nottingham (Reino Unido), por meio do grupo de pesquisa em alergia, liderado pelo Prof. Marcos Alcocer.

A **Figura 2** mostra o esquema representativo de todo o trabalho, incluindo cada uma das análises realizadas. Todas as etapas serão detalhadas nos próximos capítulos.





**Figura 1.** Esquema representativo da estratégia utilizada no trabalho, indicando que o levantamento de potenciais proteínas alergênicas foi realizado tanto através da similaridade taxonômica, quanto do 2-D *Western Blotting*, as quais são etapas complementares.



**Figura 2.** Esquema representativo de todas as principais etapas do trabalho. Etapas A e B realizadas no Brasil, etapa C realizada na Universidade de Nottingham (Reino Unido).

## 2 OBJETIVO GERAL

Clonar, expressar e purificar proteínas potencialmente alergênicas de alimentos de importância regional. Após confirmadas por ensaios imunológicos, essas proteínas serão utilizadas na construção e validação de um *microarray* através de ensaios com os soros de pacientes alérgicos aos alimentos selecionados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Material vegetal

Neste trabalho foram utilizados quatro alimentos alergênicos: abacaxi cultivar Pérola (*Ananas comosus*), mamão cultivar Golden (*Carica papaya*), mandioca cultivar IAC 576-70 (*Manihot esculenta*) e manga cultivar Palmer (*Mangifera indica*). O abacaxi foi adquirido em comércio local. O mamão e a manga foram obtidos diretamente de produtores: em Aracruz/ES (BROETTO; FABI; NASCIMENTO, 2015) e Joanópolis/SP (ANDRADE et al., 2012), respectivamente. Já as raízes tuberosas de mandioca foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo (IAC), localizado em Campinas/SP (SCHMITZ et al., 2016). Os frutos e as raízes tuberosas de mandioca foram previamente descascados, cortados em pedaços, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C para as análises posteriores. Pequenas quantidades de cada amostra foram trituradas em nitrogênio líquido e também mantidas a mesma temperatura. Vale ressaltar que os frutos e raízes foram utilizados no ponto de consumo ou preparo.

##### 3.1.2 Amostras de soros

As amostras de soros foram obtidas a partir de pacientes recrutados no Ambulatório de Alergia Alimentar do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), sob supervisão do Dr. Fabio Fernandes Morato Castro e Dra. Ariana Yang. Os soros dos pacientes alérgicos aos alimentos em questão foram previamente coletados pelos pesquisadores do HCFMUSP e armazenados a - 80°C para posteriores análises (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE no **ANEXO A**; Parecer Consubstanciado do Hospital das Clínicas do HCFMUSP no **ANEXO B**).

Foram adquiridos soros de 14 pacientes, sendo 2 alérgicos ao abacaxi, 3 alérgicos ao mamão, 2 alérgicos à mandioca, 1 alérgico à manga, 1 alérgico ao

mamão e manga, 2 alérgicos ao mamão e mandioca, 1 alérgico ao mamão, mandioca e manga, 1 paciente não-alérgico e 1 não-alérgico aos alimentos em estudo, sendo alérgico à atemoia. Os dois últimos foram utilizados como controles (**Tabela 1**). Como mostrado na **Tabela 1**, os pacientes 1, 4, 6, 9, 10, 11 e 12 possuem alergias a outros vegetais e/ou ao látex.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 *In silico***

#### **3.2.1.1 Levantamento de potenciais alérgenos presentes em alimentos de interesse local através da similaridade taxonômica**

De acordo com informação contida nos prontuários dos pacientes atendidos no ambulatório de alergia alimentar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP), fornecida pelo grupo de pesquisa liderado pelo prof. Fabio Morato Castro e Dra. Ariana Yang, alguns dos alimentos que constituem objeto de interesse na clínica em função do número de casos de alergia e, por isso, merecem uma avaliação mais aprofundada a respeito das proteínas potencialmente alergênicas, são: abacaxi (*Ananas comosus*), mamão (*Carica papaya*), mandioca (*Manihot esculenta*) e manga (*Mangifera indica*). Uma vez que as informações sobre os alérgenos dos alimentos selecionados para o estudo são limitadas, a identificação de proteínas candidatas, ou seja, daquelas potencialmente alergênicas a serem testadas nos *microarrays*, pode ser fundamentada na comparação com espécies aparentadas.

#### **3.2.1.2 Levantamento da ordem e família dos alimentos alergênicos**

Para verificar a que ordem e família pertence cada uma das espécies a que correspondem os quatro alimentos alergênicos selecionados para o estudo, foi construída uma árvore filogenética com a ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator) (<http://phylot.biobyte.de/>), que é baseada na taxonomia do NCBI.

**Tabela 1.** Informações sobre os pacientes alérgicos recrutados no Ambulatório de Alergia Alimentar do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (continua).

Paciente	Alergia principal	Gênero / Idade	Forma de preparo	Sintomas	Prick to prick / Teste de provocação oral (TPO)	ImmunoCAP	RAST	Outras alergias
1	Abacaxi	M/33	Cru e na salada de fruta	Anafilaxia – tosse, dispneia, prurido, erupção cutânea, agitação psicomotora	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Kiwi – síndrome de alergia oral (SAO); rinite
2	Abacaxi	M/6	Suco	Urticária (todo o corpo)	Negativo / Positivo	Abacaxi = 0,52	Não realizado	Medicamentos: Amoxicilina, dipirona; rinite.
3	Manga	F/22	Não disponível	Não disponível	Não disponível	Não disponível	Não disponível	Não disponível
4	Mamão	F/7	Cru	Edema palpebral	Não realizado	Clara = 21 Ovomucoide = 20 Peixe e frutos do mar = 3,8	Não realizado	Dermatite atópica severa, rinoconjuntivite alérgica, alergia ao Bactrim. Alergia alimentar: cenoura: edema palpebral; Peixe: prurido ocular; Ovo: anafilaxia.
5	Mamão	M/10	Cru	Hiperemia ocular, edema palpebral, prurido, vermelhidão.	Prick to prick: positivo	Látex < 0.35 (Class 0) - Não sensibilidade ao látex	Não realizado	Rinite e asma.
6	Mamão	F/55	Cru	Anafilaxia, prurido, edema facial e dispneia.	Prick to prick: Positivo: látex, mamão (polpa e casca); maçã (polpa e casca), manga. Negativo: abacate (todo o fruto) e aeroalérgenos / TPO - abacate: negativo	Não realizado	8.82 (Classe 3)	Síndrome látex-fruta; Anafilaxia: abacate, maçã, manga. Medicamento: diclofenaco; asma, rinite. Suco de pêssego industrializado: prurido, dispneia, vermelhidão. Exposição à luz solar: prurido intenso.
7	Mamão	F/Não disponível	Cru e cozido	Anafilaxia; dor abdominal; cólicas; prurido ocular, oral, nasal e na garganta; rinorreia hialina; rouquidão; dispneia; transpiração. Eritema local e prurido quando toca a fruta.	Prick to prick: positivo	Não realizado	Não realizado	Rinite
8	Mandioca	F/28	Mandioca crua e tapioca	Não disponível	Prick to prick - Positivo: Mandioca crua e tapioca Negativo: látex	Não disponível	Não disponível	Não disponível
9	Mandioca	F/34	Produtos de mandioca, farofa de mandioca	Angioedema facial e palpebral; prurido, urticária	Prick to prick - Positivo: látex, mandioca; <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Blomia tropicalis</i>	Não realizado	Não realizado	Rinite, asma

**Tabela 1.** Informações sobre os pacientes alérgicos recrutados no Ambulatório de Alergia Alimentar do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (conclusão).

Paciente	Alergia principal	Gênero / Idade	Forma de preparo	Sintomas	Prick to prick / Teste de provocação oral (TPO)	ImmunoCAP	RAST	Outras alergias
10	Mandioca	F/52	Cru	Anafilaxia (Severidade III), urticária	Prick to prick - Positivo: mandioca crua	Látex = 24,2 (Classe 3)	Não realizado	Látex: luvas, meias de compressão, bexigas. Sintomas: urticária; reações locais. Angioedema durante injeções de toxina botulínica. Fita cirúrgica: eritema, prurido. Dermatografia: kiwi, mamão, abacate, banana.
11	Mandioca	F/70	Cozida, frita	Anafilaxia, coceira, rinorreia, edema local, vômito, olhos irritados. Alergia externa se a raiz toca a pele.	Positivo: mamão, manga, banana e mandioca.	Látex = 0.96	Não realizado	Mamão cru e cozido, pêssego cru e cozido, maçã crua, manga crua, banana crua. Alergia externa se as frutas tocam a pele. Asma.
12	Mandioca	F/51	Sopa de mandioca	Anafilaxia, urticária, vômito, edema facial e dispneia.	Positivo: mandioca (crua, cozida e frita) pêssego e avelã. Negativo: mamão	Mamão < 0,1	Trigo < 0.1 Látex = 43,9 Frutos do mar = 0.32 Oleaginosas = 0.19	Síndrome látex-fruta: pêssego, mamão e batata. Látex: Port-a-cath. Sintomas: mamão e batata: urticária, diarreia, vômito, angioedema de língua, dispneia. Pêssegos enlatados: angioedema de língua, dispneia. Batata: Asma quando era criança.
13	Não alérgico (Controle)	M/50	-	-	-	-	-	-
14	Atemoia (Não alérgico aos alimentos em estudo) (Controle)	F/Não disponível	Crua	Anafilaxia severa com dispneia, angioedema e urticaria.	Prick to prick: positivo	Não realizado	Não realizado	Leite de vaca e ovo. Rinite, esofagite eosinofílica (EE).

### **3.2.1.3 Levantamento dos alimentos taxonomicamente próximos**

Através das famílias e ordens das espécies de cada um dos alimentos de interesse, foi possível realizar o levantamento dos alimentos próximos taxonomicamente destes. Desta maneira, uma árvore filogenética com indicação de ordens e famílias gerada com a ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator), indicando espécies taxonomicamente mais próximas daquelas dos alimentos propostos para o estudo, foi gerada.

### **3.2.1.4 Busca dos alérgenos já descritos para os alimentos em estudo e para os taxonomicamente próximos**

Primeiramente, foi feita a busca das proteínas alergênicas já descritas no banco de alérgenos *Allergome* ([www.allergome.org/](http://www.allergome.org/)) para os quatro alimentos em estudo. Após, a partir da árvore filogenética contendo os alimentos mais próximos das espécies selecionadas para o trabalho, foi feita a busca de quais destes alimentos apresentavam alérgenos já descritos no mesmo banco de alérgenos. Não foram incluídas no trabalho as isoformas das proteínas alergênicas levantadas e também os alérgenos não conhecidos (*unknown*) mencionados no *Allergome*.

## **3.2.2 2-D Western Blotting**

### **3.2.2.1 Extração e quantificação de proteínas**

A extração de proteínas das amostras foi feita com base no protocolo descrito por Carpentier et al. (2005), utilizando-se fenol tamponado com Tris (pH 8,0) para extração das proteínas seguido de precipitação com acetato de amônio em metanol, com algumas modificações. Aproximadamente 1 g de amostra previamente triturada com o auxílio de nitrogênio líquido foi pesado em tubo de centrífuga e ressuspenso em 5 mL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 5 mM ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), 100 mM KCl, 1% ditioneitol (DTT) e 30% sacarose) a 4 °C e agitado em vortex por 30 s. Após, foram adicionados 5 mL de fenol tamponado com Tris (pH 8,0) a 4 °C, seguido de agitação em vortex por 15 min



a 4 °C. Em seguida, centrifugou-se a mistura por 20 min a 6.000 x g a 4 °C, coletou-se a fase orgânica (fenol) passando-a para um novo tubo de centrifuga, adicionando-se mais uma vez 5 mL de tampão de extração para a reextração da fase orgânica. Foram utilizados o vortex e centrífuga nas mesmas condições anteriores para que novamente a fase fenólica fosse coletada. Assim, as proteínas foram precipitadas adicionando-se 25 mL de 100 mM acetato de amônio em metanol a 20 °C, seguido de incubação a mesma temperatura, por no mínimo 16 h. Após a precipitação, a mistura foi centrifugada por 40 min a 16.000 x g a 4 °C, seguido do descarte do sobrenadante. O precipitado foi lavado com 3 mL de solução de acetona a -20 °C contendo 0,2% de DTT, seco ao ar em capela por 30 min e ressuspensionado em 1 mL de tampão de ressuspensão (7 M ureia, 2 M tioureia, 4% CHAPS e 1% DTT). A suspensão do precipitado foi agitada em vortex por 1 h a temperatura ambiente, transferida para um microtubo e centrifugada por 30 min a 8.609 x g à mesma temperatura. O sobrenadante desta etapa, consistindo no extrato proteico solubilizado, foi recolhido e armazenado a -20 °C. As extrações de proteínas foram realizadas em duplicata para o abacaxi, mamão e manga, já para a mandioca as extrações foram realizadas em triplicata, porém os extratos foram unidos para a realização da quantificação.

As proteínas foram quantificadas com o auxílio do *2-D Quant Kit* (GE Healthcare), baseado nas instruções do fabricante. Neste processo ocorreu ligação específica de íons cobre às proteínas do extrato, de modo que o cobre não ligado foi medido através de um agente colorimétrico (*Working Color Reagent*) por leitura em espectrofotômetro a 480 nm. A concentração das amostras foi estimada através da comparação dos valores lidos com a curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). A absorvância lida no espectrofotômetro foi, portanto, inversamente proporcional à concentração da amostra.

### **3.2.2.2 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

Para a realização da eletroforese em condições desnaturantes foram confeccionados minigéis de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Os minigéis utilizados apresentaram as seguintes dimensões: 0,75 mm de espessura, 8,2 cm de largura e 7,2 cm de altura. Cada minigel foi constituído por um

gel de separação (12,5% de acrilamida e 5,2 cm de altura) e um gel de empilhamento ou concentração (3,75% de acrilamida e altura mínima a partir da base dos poços de 1 cm). O gel de separação foi composto por: 12,5% acrilamida, 0,374 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,2% tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 0,075% persulfato de amônio. O gel de empilhamento consistiu de: 3,75% acrilamida, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED e 0,075% persulfato de amônio. Após a polimerização dos géis, as amostras foram adicionadas de tampão de amostra três vezes concentrado de modo a alcançar as seguintes concentrações finais: 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 0,05% azul de bromofenol e 1% de DTT (LAEMMLI, 1970, com modificações). Após essa adição, aguardaram-se 15 min em repouso a temperatura ambiente para que o DTT, agente redutor, pudesse agir.

Em seguida, as amostras e o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (GE Healthcare) contendo fosforilase b (músculo de coelho) - 97 kDa, albumina (soro bovino) - 66 kDa, ovalbumina (ovo branco de galinha) - 45 kDa, anidrase carbônica (eritrócito bovino) - 30 kDa, inibidor de tripsina (soja) - 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactalbumina (leite bovino) - 14,4 kDa foram aplicados nos géis. A cuba foi preenchida com tampão de corrida (0,025 M Tris, 0,192 M glicina e 0,1% SDS, pH 8,3) e os minigéis foram submetidos a tensão fixa de 200 V por 45 min a 4 °C.

### **3.2.2.3 Eletroforese bidimensional (2-D)**

Os extratos proteicos referentes às amostras foram submetidos à eletroforese bidimensional, combinando focalização isoeletrica (IEF) (primeira dimensão), que se baseia no ponto isoeletrico (pI) das proteínas, com SDS-PAGE (segunda dimensão), no qual as proteínas são separadas por peso molecular.

#### **3.2.2.3.1 Reidratação das tiras de gradiente de pH imobilizado**

A reidratação das tiras de gradiente de pH imobilizado (*Immobiline<sup>TM</sup> DryStrip Gels* – GE Healthcare) foi realizada de forma passiva utilizando-se o suporte específico para este fim (*Immobiline® DryStrip Reswelling Tray*, Pharmacia Biotech). Para a confecção dos géis foram utilizadas tiras de pH 3-10 contendo 7 cm. O

preparo das soluções de reidratação destinadas a estes géis foi realizado da seguinte maneira: em um microtubo foram colocados o volume de extrato proteico contendo 50 µg (géis destinados ao *WB*) ou 100 µg de proteínas (géis destinados à excisão de spots – géis preparativos), seguido de tampão de lise (7 M ureia, 2 M tioureia, 4% CHAPS e 1% DTT) na quantidade suficiente para totalizar 125 µL (volume final a ser aplicado à tira), 0,5% de IPG Buffer (de acordo com o pH da tira e com o volume final) e traços de azul de bromofenol. Em seguida, foram realizadas as aplicações da solução de reidratação e da tira em suporte específico para este fim. As reidratações das tiras foram realizadas por um período de 18 h.

### **3.2.2.3.2 Focalização isoeétrica (IEF) – Primeira dimensão**

O aparelho *Ettan IPGphor II* (Amersham Biosciences®) foi utilizado para a focalização das proteínas das amostras. Após a reidratação das tiras, espalharam-se aproximadamente 10 mL de óleo mineral por todo o canal de *Manifold*, encaixaram-se as tiras, com o auxílio da pinça e espátula, com as faces contendo os respectivos géis voltadas para cima. Em seguida, em ambas as pontas das tiras foram colocados papéis de contato (*electrode wicks*) contendo 150 µL de água desionizada, e os dois conjuntos de eletrodos foram fixados e travados. A seguir, foi realizada a programação referente à focalização: 1) 300 V por 4 h, 2) aumento gradativo até 1.000 V por 30 min, 3) aumento gradativo até 5.000 V por 1 h e 20 min e, por fim, 4) mantendo a 5.000 V por 25 min, totalizando 6 h e 15 min. Foram utilizados 50 µA por tira de gradiente de pH imobilizado e temperatura de 20 °C. Após este processo, as tiras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até o momento da separação na segunda dimensão.

### **3.2.2.3.3 SDS-PAGE – Segunda dimensão**

Os géis foram constituídos por apenas gel de separação e tinham dimensões de 8,2 cm x 7,2 cm e espessura 0,75 mm, sendo compostos por: 12,5% acrilamida, 0,374 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,2% TEMED e 0,075% persulfato de amônio. Após a polimerização dos géis, as tiras de gradiente de pH imobilizado foram imediatamente equilibradas por 15 min em solução de equilíbrio (6 M ureia, 0,75 M

Tris-HCl, pH 8,8, 30% glicerol, 2% SDS e 0,002% azul de bromofenol) contendo 1% de DTT e logo após, incubadas por mais 15 min em solução de equilíbrio contendo 2,5% de iodoacetamida (IAA).

Após o equilíbrio, as tiras foram posicionadas na parte superior de cada gel sendo aplicado também o padrão de massa molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder*, por meio de um fragmento de papel para *blotting* (Whatman) de dimensão 0,5 mm x 0,5 mm previamente embebido com 3 µL dessa solução. Em seguida, as tiras de gel e os fragmentos de papel contendo o padrão de peso molecular foram fixados nos géis utilizando solução de agarose (0,5% agarose e 0,002% azul de bromofenol em tampão de corrida: 0,025 M Tris, 0,192 M glicina e 0,1% SDS, pH 8,3).

Após polimerização da agarose, a cuba foi preparada adicionando-se tampão de corrida (0,025 M Tris, 0,192 M glicina e 0,1% SDS, pH 8,3) em quantidade suficiente para preenchimento. As eletroforeses ocorreram fixando-se tensão máxima de 200 V e a temperatura ambiente.

Para o *2-D WB* os géis foram realizados em duplicata, sendo que um dos géis foi destinado à transferência de proteínas e o outro, corado com Azul de Coomassie (gel espelho) para a excisão dos spots. Os *2-D WB* referentes a cada um dos quatro alimentos foram realizados em duplicata. Os géis preparativos, destinados à excisão dos spots de interesse foram realizados em sextuplicata. Sendo assim, ao final somaram-se oito géis de cada um dos quatro alimentos: dois géis contendo 50 µg de proteínas cada um e seis géis contendo 100 µg de proteínas cada um.

#### **3.2.2.3.4 Coloração com Azul de Coomassie coloidal**

Os géis foram corados com Azul de Coomassie coloidal de acordo com o protocolo descrito por Neuhoff et al. (1988) e Neuhoff, Stamm e Eibl (1985), com pequenas modificações. Após a eletroforese, os géis foram lavados brevemente com água desionizada e incubados em solução corante (19,6% etanol, 7,84% sulfato de amônio, 1,57% ácido fosfórico e 0,1% *Coomassie Brilliant Blue G250* - Sigma) por no mínimo 16 h sob agitação constante. Após esse período, os géis foram transferidos para solução tampão de neutralização (0,1 M Tris, pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico) por 2 min. Em seguida, os géis foram descorados com 50% etanol

(por 30 s) e, após, transferidos para a solução fixadora (20% sulfato de amônio) por no mínimo 16 h sob agitação. Todo o processo (coloração, neutralização, descoloração e fixação) foi repetido e, em seguida, os géis foram armazenados a 4 °C.

#### **3.2.2.3.5 Aquisição das imagens dos géis**

As imagens dos géis corados com Azul de Coomassie coloidal foram obtidas em sistema de fotodocumentação *VersaDoc MP 4000* (Bio-Rad) através do programa *Quantity One* (Bio-Rad) e foram adquiridas utilizando-se fonte de luz branca, sem filtros.

#### **3.2.2.4 Western Blotting**

##### **3.2.2.4.1 Transferência de proteínas**

Após a eletroforese, os géis que não foram corados com Azul de Coomassie tiveram suas proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL 0,45 µm – Amersham Biosciences) em tampão Tris/Glicina (pH 8,3) / metanol 20%, a voltagem constante de 100 V por 1 hora a 4 °C no aparato de transferência *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad).

##### **3.2.2.4.2 Coloração das membranas com *Deep Purple* e aquisição das imagens**

Após a transferência de proteínas, as membranas foram coradas com *Deep Purple* (GE Healthcare) de acordo com protocolo descrito pelo fabricante, e reveladas em sistema de fotodocumentação *Typhoon* (Amersham Biosciences).

##### **3.2.2.4.3 Bloqueio das membranas e incubação com os soros dos pacientes alérgicos e anticorpo secundário**

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LIM 60), localizado na Faculdade de Medicina da USP.

Após a transferência das proteínas, a membrana foi bloqueada com tampão TBS-T pH 7,6 (120 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7,6 ajustado com HCl) adicionado de leite em pó desnatado a 5%, durante 60 minutos de incubação a 4 °C, seguido de mais 60 minutos de incubação a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as proteínas foram incubadas por 16 horas a 4°C, juntamente aos soros dos pacientes alérgicos aos alimentos de interesse na diluição 1:10, em TBS-T pH 7,6 adicionado de leite em pó desnatado 5%. Após manter as membranas por 1 hora a temperatura ambiente, estas foram lavadas três vezes com TBS-T pH 7,6 por 10 minutos a mesma temperatura. Em seguida das lavagens, as membranas foram incubadas juntamente com anticorpo secundário IgE Goat Anti-Human pAb, HRP (Horseradish Peroxidase) Conjugate (Invitrogen – H15707) na diluição 1:7500 por 1 hora a 4° C e por mais 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram submetidas a três lavagens de 10 minutos com tampão TBS-T pH 7,6 a temperatura ambiente.

#### **3.2.2.4.4 Revelação das membranas e aquisição das imagens**

Após a última lavagem, as membranas foram reveladas com *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare – RPN2232), de acordo com as instruções do fabricante. As imagens das membranas reveladas com *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* foram obtidas por quimioluminescência em sistema de fotodocumentação ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

#### **3.2.2.5 Análise das imagens e excisão dos spots de interesse**

Os spots de interesse foram selecionados comparando-se as imagens referentes aos géis espelho e preparativos (corados com Coomassie coloidal) às membranas coradas com Deep Purple e às membranas reveladas referentes ao 2-D WB. Após análise, os spots selecionados para a excisão foram primeiramente, os que apresentaram maior intensidade de coloração quando revelados com ECL Prime e, em seguida, os que seriam mais facilmente excisados dos géis.

Os spots de interesse foram coletados com o auxílio de ponteiras de 1 mL, cortadas com a ajuda de uma lâmina de bisturi em diversos diâmetros de acordo

com os tamanhos dos *spots*, simulando uma punção. No caso de *spots* não arredondados, foi utilizada lâmina de bisturi diretamente. Cada *spot* coletado dos géis foi transferido para microtubo de 1,5 mL e armazenado a 4 °C. Após todos os *spots* serem coletados, foram mantidos a -80 °C para procedimentos posteriores (digestão, purificação e identificação das proteínas por espectrometria de massa).

### 3.2.2.6 Digestão com tripsina

A digestão das proteínas contidas nos *spots* de gel foi realizada com base no protocolo descrito por Shevchenko et al. (2007), com modificações. As vidrarias utilizadas foram enxaguadas previamente com metanol para remoção de detergentes e toda a manipulação foi feita com luvas de nitrila, para que não houvesse contaminação da amostra por outras proteínas. Para evitar contaminação por polímeros, foram utilizadas ponteiras e microtubos novos e não siliconizados.

Primeiramente, os *spots* isolados foram descongelados e fragmentados sobre placa de *Petri* de vidro com o auxílio de lâmina de bisturi, em partes de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, e transferidos para microtubos de centrífuga (1,5 mL) com a assistência de pipeta *Pasteur* de vidro e água desionizada. Em seguida, os fragmentos de gel foram lavados três vezes ou mais até completa remoção do corante, com 200 µL de solução de descoloração (50% acetonitrila e 25 mM bicarbonato de amônio). Logo após, a mistura foi agitada em vortex, sendo que a cada lavagem houve intervalo de 5 a 10 min. A solução de descoloração foi removida através de uma pipeta *Pasteur* de vidro e os fragmentos de gel foram desidratados com 100% acetonitrila (200 µL) por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 15.000 x g à temperatura ambiente até completa volatilização da acetonitrila. A etapa de desidratação foi repetida e, ao final, a acetonitrila restante foi evaporada à temperatura ambiente em capela de exaustão por 15 a 20 min. Na sequência, partiu-se para a etapa de redução, sendo os fragmentos de gel reidratados pela adição de 40 µL de solução de redução (20 mM DTT e 50 mM bicarbonato de amônio) e, após, mantidos a 56 °C por 40 min. Em seguida, os fragmentos foram centrifugados a 15.000 x g à temperatura ambiente por 15 a 20 min, para a remoção completa da solução de redução.

Para a etapa de alquilação, foram adicionados aos fragmentos 40  $\mu\text{L}$  de solução de alquilação (55 mM IAA e 50 mM bicarbonato de amônio), cobrindo-os totalmente. Em seguida, as amostras foram incubadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 min. Após, os fragmentos foram centrifugados a 15.000 x g à temperatura ambiente por 15 a 20 min e o sobrenadante foi descartado. Assim, adicionaram-se aos fragmentos 200  $\mu\text{L}$  de 25 mM bicarbonato de amônio (solução de lavagem), sendo a mistura agitada em vortex. A solução de lavagem foi removida com pipeta *Pasteur*, e em seguida repetiu-se por mais duas vezes a etapa de desidratação, sendo que ao final o resíduo restante foi seco à temperatura ambiente em capela de exaustão por 15 a 20 min. Neste ponto, as amostras foram mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até que se prosseguisse com a digestão.

Para a etapa de digestão, alíquotas de solução de tripsina (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) (Promega) foram adicionadas de 50 mM bicarbonato de amônio a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo que ao final obteve-se uma solução de concentração 20 ng/ $\mu\text{L}$  de enzima. Em seguida, aos fragmentos de gel desidratados e descongelados foram adicionados pelo menos de 15  $\mu\text{L}$  (quantidade suficiente para cobri-los) de solução de tripsina (20 ng/ $\mu\text{L}$ ). Após 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para que a tripsina penetrasse nos fragmentos, foram adicionados 50 mM de bicarbonato de amônio até cobertura completa da amostra (40  $\mu\text{L}$ ), sendo feita incubação por 14 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para a etapa de eluição dos peptídeos, a ação da tripsina foi interrompida por adição de 15  $\mu\text{L}$  de solução bloqueadora (5% ácido fórmico e 60% acetonitrila). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e, em seguida, foi adicionado aos fragmentos de gel remanescentes volume de solução de eluição I (1% ácido fórmico e 60% metanol) suficiente para cobri-los (40  $\mu\text{L}$ ). Assim, os fragmentos foram incubados por 15 min a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (com agitação em vortex a cada 5 min) e, após, o sobrenadante foi recuperado para o mesmo microtubo contendo o sobrenadante da digestão e a solução bloqueadora. Este passo foi repetido e novamente o sobrenadante foi recolhido.

A seguir, adicionou-se volume suficiente (40  $\mu\text{L}$ ) de solução de eluição II (1% ácido fórmico e 50% acetonitrila) para cobrir os fragmentos de gel e os mesmos passos seguidos para a etapa da eluição I foram realizados, recolhendo-se os sobrenadantes para o mesmo microtubo contendo a eluição I. Para a eluição III, foram adicionados sobre os fragmentos de gel 40  $\mu\text{L}$  (volume suficiente para cobri-



los) de acetonitrila 100%, sendo a amostra agitada em vortex até completa desidratação do gel, indicada pelo fato de que os fragmentos se soltaram da parede do microtubo. O sobrenadante foi recuperado e transferido para o mesmo microtubo contendo os sobrenadantes das eluições I e II. A solução final, contendo os peptídeos eluídos do gel, foi concentrada em concentrador à vácuo *CentriVap* (LABCONCO) à temperatura ambiente até 1  $\mu$ L. As amostras foram armazenadas a -20 °C até a realização da etapa de purificação.

### **3.2.2.7 Purificação dos extratos contendo os peptídeos obtidos através da digestão**

A purificação dos extratos contendo os peptídeos foi baseada no protocolo descrito pelo fabricante, com modificações. Foi utilizado o *ZipTipC<sub>18</sub>, P-10* (Millipore), o qual é uma ponteira de 10 mL contendo uma coluna de purificação em sua extremidade. Vale observar que os mesmos cuidados da etapa de digestão, relativos à contaminação, foram seguidos.

Primeiramente, as amostras contendo os peptídeos, armazenadas a -20 °C foram homogeneizadas em vortex a temperatura ambiente. Em seguida, para o preparo das amostras, adicionaram-se às mesmas 10  $\mu$ L de solução contendo 0,1% ácido trifluoroacético (TFA), obtendo-se pH menor que 4,0. O equilíbrio do *ZipTipC<sub>18</sub>, P-10*, foi realizado em três etapas. Para a etapa I de equilíbrio, ajustou-se o *ZipTip* em um pipetador (10  $\mu$ L) e aspiraram-se 10  $\mu$ L de solução de 0,1% TFA e 99,9% de acetonitrila, descartando-a. Para a etapa II de equilíbrio do *ZipTip*, aspiraram-se 10  $\mu$ L de solução contendo 0,1% TFA e 50% acetonitrila, descartando-a. Após, para a etapa III, 10  $\mu$ L de solução contendo 0,1% TFA foram aspirados e descartados. Em seguida, partiu-se para a etapa de ligação da amostra à coluna. Para isto, 10  $\mu$ L da amostra de peptídeos preparada inicialmente foram repipetados de sete a dez vezes, garantindo a fixação da mesma à coluna. Para a lavagem, 10  $\mu$ L de solução contendo 0,1% TFA e 5% metanol foram repipetados por três vezes. Para a eluição dos peptídeos, repipetaram-se em um *Total Recovery vial* de 1mL (Waters) 10  $\mu$ L de solução de 0,1% TFA e 50% acetonitrila por sete a dez vezes. Após, a solução foi totalmente seca em concentrador à vácuo *CentriVap*, e os peptídeos foram armazenados a -80 °C até a etapa de sequenciamento.

### 3.2.2.8 Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa

As amostras foram ressuspensas em 20  $\mu\text{L}$  de formiato de amônio 20 mM pH 10. Os peptídeos foram sequenciados no espectrômetro de massa *Synapt G2 HDMS* (Waters), acoplado ao sistema *Acquity UPLC MClass*, com tecnologia 1D Simulado (Waters). Os peptídeos foram capturados por uma coluna *Trap 2-D Symmetry C18* (5  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm) (Waters) e a separação foi realizada com uma coluna de primeira dimensão *Acquity UPLC M-Class peptide BEH C18* (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$  x 50 mm) (Waters) e uma coluna analítica *Acquity UPLC M-Class peptide CSH C18* (1.7  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm) (Waters). As fases móveis da primeira dimensão foram: solução de formiato de amônio 20 mM pH 10 e acetonitrila. Já na segunda dimensão, os dois eluentes utilizados foram: A (100% água contendo 0,1% de ácido fórmico) e B (100% acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico).

O gradiente da primeira dimensão se iniciou com 97% de formiato de amônio e 3% de acetonitrila. Em 4,6 minutos foram atingidos 55% de formiato de amônio e 45% de acetonitrila, sendo que até completar 10 minutos a condição inicial foi restabelecida. O fluxo foi de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

O gradiente analítico da fase móvel se iniciou com 93% A e 7% B, sendo que por 21 minutos o gradiente mudou linearmente para 55% A e 45% B. Logo após 2 minutos, foi atingido 15% A e 85% B. Em 2 minutos a coluna restabeleceu a condição inicial. O fluxo foi de 0,400  $\mu\text{L}/\text{min}$  e foram injetados 9  $\mu\text{L}$  da amostra.

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massa do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) *Synapt G2 MS*, equipado com uma fonte nanolockspray operando no modo positivo (Waters, Manchester, UK), com *ion mobility*. Para todas as análises o espectrômetro de massa operou no modo "V", com a cela de *ion mobility* ativada. O equipamento foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana 1  $\mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , e a mesma solução foi empregada para o "lock mass" utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo HDMS<sup>E</sup> (análise independente de dados), que consiste na aquisição alternada entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão. Essas energias de colisão foram aplicadas ao módulo *trap* do 'T-wave' CID em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de

varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de  $m/z$  entre 50 e 2000.

### 3.2.2.9 Análise dos dados obtidos através da espectrometria de massa

Os espectros de massa foram processados utilizando o *software ProteinLynx GlobalServer* (PLGS) versão 3.1, com os bancos de dados reversos de *Ananas comosus* v3 (abacaxi), *Carica papaya* v0.4 (mamão) e *Manihot esculenta* v6.1 (mandioca) depositados no *Phytozome* v11.0 ([www.phytozome.jgi.doe.gov](http://www.phytozome.jgi.doe.gov)) e, com os bancos de dados reversos *Mangifera indica* e Sapindales (manga) encontrados no Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Vale observar que na época da análise: 82,7% do genoma do abacaxi havia sido descoberto (MING et al., 2015); já havia o genoma completo do mamão (MING et al., 2008); 96,2% do genoma da mandioca havia sido descoberto (BRADESON et al., 2016) e mais de 95% do genoma da manga tinha sido sequenciado (SINGH et al., 2014).

Os parâmetros de processamento dos espectros incluíram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de três íons-fragmento correspondentes por peptídeo; mínimo de sete íons-fragmento correspondentes por proteína; mínimo de dois peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso positivo (FDR) a 4%.

### 3.2.3 Expressão recombinante

#### 3.2.3.1 Transformação de células competentes

Para transformar as células competentes (*E. coli* TH5alpha), 25  $\mu$ L de células e 1  $\mu$ L de DNA referente a cada potencial alérgeno foram adicionados a um microtubo de 1,5 mL e homogeneizados para cada transformação. Os tubos foram incubados em gelo por 30 min e as células foram aquecidas por 20 seg a 42°C sem agitação. Após, os tubos foram colocados em gelo por 2 min, e 500  $\mu$ L de meio S.O.C. pré-aquecido a 50°C contendo 25  $\mu$ g/mL de zeocina foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram incubados por 1 h a 225 rpm e 37°C, e 100  $\mu$ L de cada

transformação foram adicionados em placas de Petri pré-aquecidas contendo meio *Low Salt Lysogeny Broth (LB)* com 50 µg/mL de zeocina. As placas foram incubadas por 48 h a 37°C para a formação de colônias.

### **3.2.3.2 Purificação dos plasmídeos**

A purificação dos plasmídeos foi realizada com o auxílio do kit *Plasmid Mid* (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante e algumas modificações. Uma colônia de cada placa foi selecionada e inoculada em uma cultura inicial de 10 mL de meio *LB* contendo 25 µg/mL de zeocina. A solução foi incubada por 8 h a 37°C a 225 rpm. Em um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de meio *Low Salt LB* foram adicionados 500 µL da última cultura. A cultura foi incubada por 12-16h a 37°C a 225 rpm. As células bacterianas foram coletadas através de centrifugação a 6000 x *g* por 15 min a temperatura ambiente. Os passos seguintes de lise foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, e o sedimentado contendo o DNA foi redissolvido em 100 µL de tampão Tris-EDTA, pH 8,0.

### **3.2.3.3 Concentração de DNA e sequenciamento**

Para a determinação do rendimento, a concentração de DNA foi quantificada com o auxílio do espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US) seguindo as instruções do fabricante. O tampão Tris-EDTA foi utilizado como branco.

O serviço de sequenciamento dos plasmídeos foi adquirido juntamente à *Source Bioscience* (Nottingham, UK).

### **3.2.3.4 Linearização do vetor pPICZ A**

Para a eficiente integração do genoma de *P. pastoris*, as construções pPicZ A contendo os genes referentes aos potenciais alérgenos foram linearizados através da mistura de 10% do tampão *Cut Smart 10X* (New England Biolabs, Massachusetts, US), 2,5% da enzima de restrição PmeI (Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, US), 10 µg de DNA e água esterilizada para um volume total de 20 µL. A mistura foi incubada a 37°C por 2 h e 3X etanol 100% a -20°C foi adicionado. Os tubos foram mantidos por 1 h a -20°C e centrifugados por 20 min a 4°C. O etanol foi evaporado em capela de exaustão por 20 min e as construções linearizadas foram ressuspensas em 10 µL de água desionizada.

### 3.2.3.5 Transformação de *Pichia pastoris*

A transformação de *Pichia pastoris* foi realizada de acordo com o manual do kit *pPICZ A, B, and C: Pichia expression vectors for selection on zeocin and purification of recombinant proteins* (Invitrogen, Life Technologies Corporation, California, US). A cepa X-33 (50 µL) foi cultivada em 100 mL do meio extrato de levedura peptona dextrose (YPD) contendo 400 µg/mL de blasticidina em um frasco *Erlenmeyer* (250 mL) durante 12h-16h a 30°C sem agitação, e por mais 24 h a 160 rpm a mesma temperatura. Em um frasco *Erlenmeyer* (500 mL) contendo 250 mL de meio fresco, foram inoculados 8 mL da cultura *overnight*, e esta mistura foi incubada a 160 rpm a 30°C. A densidade óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) foi medida a cada 2 h até alcançar aproximadamente 1,3.

As células foram centrifugadas quatro vezes a 2000 x g por 10 min a 4°C, sendo o sedimentado ressuspensado sequencialmente em 250 mL de água esterilizada gelada (0-4°C), em 125 mL de água esterilizada gelada, em 10 mL de 1 M de sorbitol a 4°C, e por final, em 600 µL 1 M sorbitol a 4°C. Da última ressuspensão, 40 µL foram adicionados a 5 µL do DNA pPICZ linearizado, e a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm a 4°C. As células foram transformadas por eletroporação em um eletroporador (Biorad, Hertfordshire, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Imediatamente, foram adicionados 600 µL de 1 M sorbitol a 4°C a cubeta, e seu conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL esterilizado. O tubo foi incubado a 30°C por 1 h sem agitação e 200 µL de cada tubo foram espalhados em uma placa contendo o meio extrato de levedura peptona dextrose solidificado com sorbitol (YPDS) contendo 400 µg/mL de zeocina. As placas foram incubadas por 2-3 dias a 30°C até as colônias se formarem.

### 3.2.3.6 Expressão em *P. pastoris* das proteínas potencialmente alergênicas em microplaca

Dentre 1 a 10 colônias referentes a cada transformação foram selecionadas e adicionadas individualmente em um poço de uma placa de 96 poços contendo 200  $\mu\text{L}$  de YPD com 300  $\mu\text{g/mL}$  de zeocina. As placas foram incubadas durante 12h-16h a 30°C sem agitação. Em uma placa de 24 poços contendo 1 mL de *Buffered Minimal Glycerol* (BMG) com traços de biotina em cada poço, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da última mistura *overnight*, e as placas foram incubadas a 30°C a 60 rpm por 96 h. As placas foram centrifugadas a 7000 x *g* a 4°C por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Em cada poço foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de *Buffered Minimal Methanol* (BMM) com traços de histidina e 1% de metanol para ressuspender as células, e as placas foram incubadas a 30°C a 60 rpm por 72 h. Um por cento de metanol foi adicionado duas vezes ao dia para compensar a evaporação. Após, as placas foram centrifugadas a 7000 x *g* por 10 min, e o sobrenadante foi transferido para um poço de uma placa de poços fundos para a realização do *Dot Blot*.

### 3.2.3.7 *Dot Blot*

Para confirmar a expressão correta de proteína pelos clones de *Pichia*, avaliar o nível de expressão de proteínas secretadas e escolher os melhores clones, foram confeccionados *Dot Blots* utilizando o aparato *Manifold Dot Blot* (Cole-Parmer, UK) e membranas de PVDF (Whatman, Maidstone, UK), de acordo com as instruções do fabricante. Em cada poço, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de cada uma das misturas contendo as proteínas secretadas pela *Pichia*, e as membranas foram secas a temperatura ambiente. Anticorpos específicos para as proteínas alergênicas de noz (pMJA 186) e amêndoa (pMJA 181), produzidos e disponibilizados por um grupo espanhol da *Universidad Complutense de Madrid*, foram utilizados como controles negativos. Após, as membranas de PVDF foram reativadas com metanol e lavadas com PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4). Depois da reativação, as membranas foram bloqueadas por 2 h: 1 h a 4°C e por mais 1 h a temperatura ambiente com solução bloqueadora (TBS-T 0,05% contendo 5% de leite desnatado em pó). As membranas contendo os potenciais alérgenos de

abacaxi, mamão, mandioca e manga secretados pela *Pichia* foram incubadas por 12-16 h a 4°C em solução bloqueadora contendo um *pool* de soros referentes a seus respectivos pacientes alérgicos (1:10) (Exceção: apenas um paciente alérgico à manga – **Tabela 1**). Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com solução de lavagem (TBS-T 0,05%) a temperatura ambiente, e em seguida, foram incubadas com solução bloqueadora contendo o anticorpo secundário anti IgE humana biotilado (Epsilon Chain Specific) (Vector Laboratories, California, US) (1:400) a 37°C por 2 h. Logo após, as membranas foram lavadas novamente nas mesmas condições e foram incubadas com solução bloqueadora contendo estreptavidina-Cy5 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US) (1:2000) a 37°C por 30 min. Assim, as membranas foram lavadas com solução de lavagem e 3 vezes mais por 10 min com água desionizada. Após a lavagem, essas foram secas a temperatura ambiente e submetidas ao sistema de imagem *Typhoon Trio Variable Mode* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.2.3.8 Expressão dos potenciais alérgenos em *Pichia pastoris* cultivada em Erlenmeyer**

Após a seleção dos melhores clones por *Dot Blot*, a expressão das proteínas foi realizada novamente, porém em maior-escala. Assim, dois clones referentes a cada potencial proteína alergênica foram escolhidos, e 50 µL da cultura *overnight* contendo YPD com 300 µg/mL de zeocina e 1 colônia referente às células transformadas foram cultivadas por 12-16h a 30°C em 10 mL de BMG com 300 µg/mL de zeocina e traços de biotina. Após a incubação, 8 mL de cada cultura *overnight* foram adicionados a 90 mL de BMG contendo biotina e incubados até o DO<sub>400</sub> (1:10) alcançar entre 0,8 – 1,2. Cada cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimentado foi ressuspendido em 100 mL de BMM com traços de histidina, e a cultura foi induzida por 3 dias com 1 % de metanol a cada 12 h. Após a incubação, para a coleta das proteínas secretadas pela *Pichia*, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi liofilizado em liofilizador CRYODOS (Telstar Life Science, West Yorkshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.2.3.9 Purificação dos potenciais alérgenos

As proteínas alergênicas foram separadas das demais proteínas secretadas pela *Pichia pastoris* através do sistema ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) equipado com colunas HisTrap HP de 1 mL ou 5 mL (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Apenas para as proteínas gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase C2 (GDPC2), potencial alérgeno do abacaxi, e para a RmlC-like cupina, potencial alérgeno da mandioca, foi utilizado o tampão de ligação à coluna sem ureia, contendo 20 mM de fosfato de sódio, 0,5 M de NaCl e 20 mM de imidazol. Foram utilizados os tampões de eluição, também sem ureia, contendo 20 mM de fosfato de sódio, 0,5 M de NaCl e 500 mM de imidazol para a cupina (mandioca), e 1000 mM imidazol para a GDPC2 (abacaxi), a um fluxo de 3 mL/min. Vale ressaltar que nestas condições, sem ureia, não houve formação de pico para a cupina.

Ainda utilizando o sistema ÄKTA FPLC equipado com a coluna HisTrap HP, o sobrenadante da *Pichia* liofilizado contendo a proteína cupina foi testado em diferentes condições. O liofilizado foi diluído em 5 M de ureia, centrifugado a 7000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado e carregado em colunas de 1 mL e 5 mL, separadamente. Os tampões de eluição utilizados nesses casos foram 5 M ureia contendo 200 mM de imidazol para a coluna de 1 mL, e 100 mM de imidazol para a coluna de 5 mL, a um fluxo de 3 mL/min.

Além disso, a cromatografia de fase reversa (FR) com uma coluna C8 (10 cm x 10 mm, Varian, CA, US) foi testada apenas para a cupina da mandioca. A amostra usada na FR foi o chamado *flow-through* (FT), ou seja, parte que não se ligou à coluna) coluna HisTrap, com adição do sobrenadante liofilizado secretado pela *Pichia* e água desionizada. Para o volume final de 80 mL de amostra, foi adicionado 0,1% de ácido fórmico. Como tampões de eluição foram utilizados 20% e 40% de acetonitrila (ACN) contendo 0,1% de ácido fórmico.

Para todas as outras amostras, o sistema ÄKTA FPLC equipado com a coluna HisTrap HP 5 mL foi utilizado. Os sobrenadantes liofilizados foram dissolvidos em 5 M ureia e o tampão de eluição usado foi 5 M ureia contendo 400 mM de imidazol, a um fluxo de 3mL/min.



No total, foram geradas 52 frações, entre elas FT e picos (frações que se ligaram à coluna). Para algumas purificações foram gerados dois picos (pico 1 e pico 2), os quais também foram incluídos no *array*.

Todas as frações coletadas contendo as proteínas recombinantes foram dializadas contra água destilada por 72h a 4°C, liofilizadas (Laboratory Freeze Dryer CRYODOS) e armazenadas a 20°C.

#### **3.2.3.10 Determinação da concentração de proteínas purificadas recombinantes**

As concentrações das proteínas purificadas recombinantes foram determinadas através de metodologia baseada no uso de ácido bicinconínico (BCA) para ensaio de proteína (Pierce, Rockford, IL, US) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como branco. O espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante.

#### **3.2.3.11 Verificação da qualidade da purificação de proteínas**

Eletroforeses em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas usando géis Bis-Tris NuPAGE 4-12% contendo 1,0 mm de espessura e 15 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US), de acordo com as instruções do fabricante. O padrão de massa molecular *Precision plus protein* (Biorad, Hertfordshire, UK) foi utilizado, e as bandas proteicas foram coradas com prata. A eletroforese foi conduzida a 60 V e ocorreu a temperatura ambiente.

Para a devida avaliação das bandas proteicas referentes aos 19 potenciais alérgenos, as sequências (dados não mostrados) e massas moleculares das proteínas recombinantes maduras foram acessadas com o programa Vector NTI e o website [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/).

#### **3.2.3.12 Confirmação da expressão das proteínas de interesse**

Para a confirmação da expressão das 19 proteínas de interesse, foi realizado o sequenciamento dos peptídeos presentes nos extratos de proteínas secretadas pela *Pichia pastoris* através da MS.

Primeiramente, foi feita a digestão de proteínas com base no protocolo descrito por Shevchenko et al. (2007). Em seguida, para a purificação dos extratos contendo os peptídeos, foi utilizado o *ZipTipC<sub>18</sub>, P-10* (Millipore), o qual é uma ponteira de 10 mL contendo uma coluna de purificação em sua extremidade, de acordo com as instruções do fabricante.

Para o sequenciamento, o equipamento Impact II UHR-QqTOF (*Ultra-High Resolution Qq-Time-Of-Flight*) (Bruker, Massachusetts, EUA) foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante. Além disso, para a análise dos dados foram utilizados os programas DataAnalysis, Biotoools e Sequence Editor (Bruker, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.2.4 Microarray**

#### **3.2.4.1 Produção do *microarray***

##### **3.2.4.1.1 Preparação das lâminas de proteína**

Os biochips de proteína foram confeccionados manualmente para testes usando o *MicroCaster Arrayer System* (Whatman, Maidstone, UK) (dados não mostrados), e para os *arrays* automatizados foi empregado o equipamento *Microarrayer MicroGrid* (Digilab, Massachusetts, US) com agulhas sólidas, sendo em ambos de acordo com as instruções dos fabricantes. As lâminas de vidro contendo 16 quadrantes de nitrocelulose foram adquiridas juntamente a *Oncyte SuperNova* (Grace Bio-labs, OR, US). Para a impressão das proteínas nas lâminas com o equipamento *Microarrayer MicroGrid*, as proteínas provindas da coluna His-Tag de 5 mL foram dissolvidas a concentrações finais de 1000 µg/mL (*flow through* - FT) e 141,8 µg/mL (picos) em PBS e 10% de glicerol. O anticorpo específico para amêndoa produzido por um grupo espanhol da *Universidad Complutense de Madrid* (disponível no laboratório do grupo de alergia alimentar da UoN), tampão PBS contendo 10% de glicerol, BSA 2% e leite em pó desnatado 2% foram usados como

controles negativos. Além disso, 1:100 e 1:10 de estreptavidina-Cy3 e estreptavidina-Cy5 foram utilizadas como marcadores. Dezesesseis cópias de cada uma das 60 amostras foram impressas em cada lâmina, 60 em cada quadrante, e o total de 3 *slides* foi confeccionado. Após a impressão das proteínas, as lâminas foram reveladas usando o *GenePix 4000B microarray scanner* (Molecular devices, California, US), seguindo as instruções do fabricante, para verificar a qualidade da impressão.

### 3.2.4.1.2 Hibridização

As lâminas com as proteínas impressas foram bloqueadas com 3% de BSA em PBS por 3 h a 37°C no escuro em um mini forno de hibridização rotativo (Appligene, Fisher Scientific, Massachusetts, US). Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 por 3 vezes durante 2 min, e em água desionizada por 5 vezes durante 1 min. Para a secagem dos *slides*, estes foram centrifugados a 1000 rpm por 10 min e revelados usando o *scanner GenePix 4000B*.

Após a secagem, os *slides* foram reidratados com 150 µL/poço de PBS contendo 0,2% de Tween 20 (0,2% PBST), e após, foram incubados com 100 µL/poço de soro diluído em 2% de BSA contendo 0,2% de PBST (3:10) por 12-16h a 4°C sob agitação. O poço de número quatro (Branco) foi incubado com 100 µL de 2% de BSA em 0,2% PBST. Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes com 0,05% PBST usando o equipamento *BioTek microplate washer* (BioTek, VT, US), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 100 µL do anticorpo anti IgE humana biotilado (Epsilon Chain Specific) (Vector Laboratories, California, US) diluídos (1:400) em 1% de BSA em 0,2% de PBST foram adicionados em cada poço, e as lâminas foram incubadas a 37°C por 2 h em um hibridizador *Thermo hybrid* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US) sob agitação. Após a incubação, as lâminas foram lavadas novamente sob as mesmas condições, e 100 µL de estreptavidina Cy5 (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) diluídos em 1% de BSA em 0,2% de PBST (1:2000) foram adicionados em cada poço e os *slides* foram incubados a 37°C por 30 min no *Thermo hybrid* sob agitação. Assim, os *slides* foram lavados 3 vezes com 0,05% de PBST e 3 vezes com água desionizada

no equipamento *BioTek microplate washer* e centrifugados a 1000 rpm por 10 min. Em seguida, as lâminas foram reveladas usando o *GenePix 4000B microarray scanner*, de acordo com as instruções do fabricante.

#### **3.2.4.1.3 Análise dos dados gerados após a revelação dos biochips**

As imagens dos 3 biochips foram analisadas com o programa *GenePix* (Molecular devices, California, US), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados gerados pelo programa *GenePix* foram normalizados e a intensidade do sinal de fluorescência de cada amostra (*spot*) foi calculada pela subtração do sinal de fundo (*background*) local, e a média gerada através das três replicatas de *slides* foi utilizada para a confecção de gráficos.

Os gráficos foram confeccionados através do programa *GraphPad Prism 7* e o Teste T pareado foi utilizado para a análise dos dados. Os valores referentes ao Branco (B), Paciente não-alérgico (NA) e Paciente não-alérgico aos alimentos estudados foram utilizados como controles. Assim, foi realizado o Teste T referente a cada um dos valores das intensidades dos *spots* contra os valores referentes ao Branco, ao NA e ao NAA.

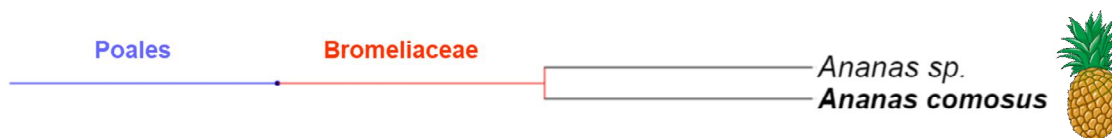
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *In silico*

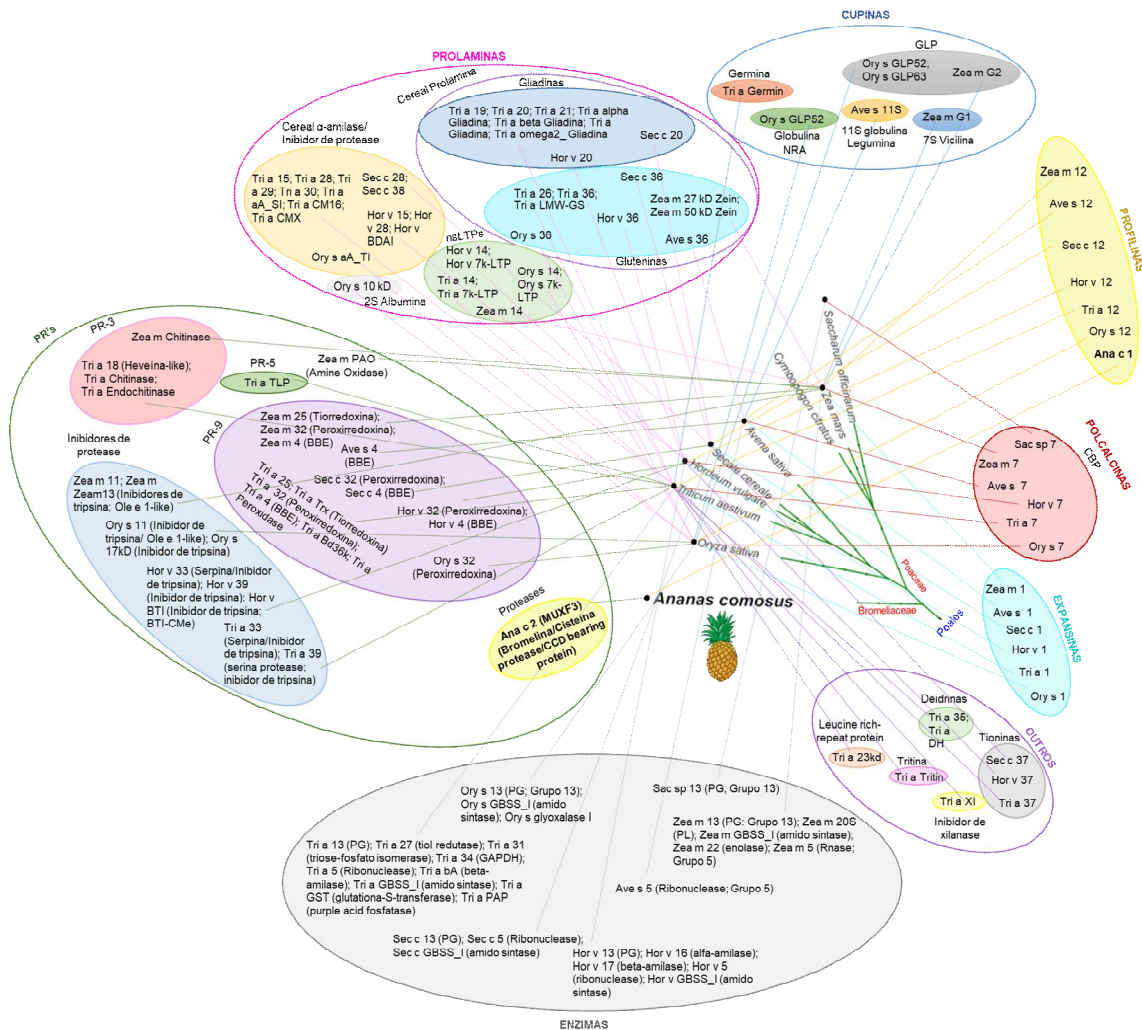
#### 4.1.1 Abacaxi

A árvore filogenética da **Figura 3** mostra que o abacaxi (*Ananas comosus*) pertence à ordem Poales e família Bromeliaceae. Através desse levantamento, foi possível encontrar quais alimentos são taxonomicamente mais próximos do abacaxi: arroz (*Oryza sativa*), aveia (*Avena sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim-limão (*Cymbopogum citratus*), centeio (*Secale cereale*), cevada (*Hordeum vulgare*), milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*). Após isso, foi possível verificar no banco de alérgenos, *Allergome*, para quais desses alimentos há relatos de alérgenos: arroz (*Oryza sativa*), aveia (*Avena sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), centeio (*Secale cereale*), cevada (*Hordeum vulgare*), milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*) (**Figura 4**).

Assim, comparando os alérgenos já descritos para o abacaxi, *Ana c 1* e *Ana c 2*, respectivamente pertencentes às famílias das profilinas e das proteases, estas últimas fazendo parte das PR's, com os alérgenos já descritos para os alimentos taxonomicamente próximos deste alimento, foi possível formar a hipótese de que cupinas, prolaminas, polcalcinas, expansinas, outras PR's, como, por exemplo, inibidores de protease e PR-9, e enzimas, como enolases, sejam prováveis alérgenos do abacaxi (**Figura 4**).



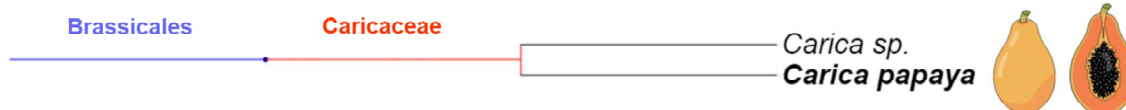
**Figura 3.** Árvore filogenética contendo as espécies do gênero *Ananas* (*Ananas sp.*) e o abacaxi (*Ananas comosus*), indicando a ordem (azul) e família (vermelho) deste alimento, gerada pela ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator).



**Figura 4.** Árvore filogenética com indicação da ordem (Poales – em letras azuis) e famílias (letras vermelhas) do abacaxi (*Ananas comosus* – em negrito) e de espécies taxonomicamente mais próximas a este, gerada com a ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator). Na figura também estão indicados, através de linhas pontilhadas coloridas, os alérgenos já descritos para o abacaxi (em negrito) e para cada um dos alimentos aparentados com este alimento (quando existentes). As famílias de alérgenos estão mostradas através de balões coloridos.

### 4.1.2 Mamão

Na **Figura 5** está apresentada a árvore filogenética do mamão (*Carica papaya*), um membro da ordem Brassicales e família Caricaceae. Através desse levantamento, foi possível encontrar quais alimentos são mais próximos taxonomicamente do mamão: alcaparra (*Capparis spinosa*), brócolis (*Brassica oleracea italica*), colza (*Brassica napus*), couve-flor (*Brassica oleracea botrytis*), mamão-do-mato (*Jacaratia spinosa*), mostarda branca (*Sinapis alba*), mostarda mar-



**Figura 5.** Árvore filogenética contendo as espécies do gênero *Carica* (*Carica sp.*) e o mamão (*Carica papaya*), indicando a ordem (azul) e família (vermelho) deste alimento, gerada pela ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator).

rom (*Brassica juncea*), nabo (*Brassica rapa*), rabanete (*Raphanus sativus*), raiz forte (*Armoracia rusticana*), repolho (*Brassica oleracea capitata*), e rúcula (*Eruca vesicaria* subsp. sativa). Após isso, foi possível verificar no banco de alérgenos, os alimentos mais próximos do mamão e que possuem proteínas alergênicas descritas: alcaparra (*Capparis spinosa*), brócolis (*Brassica oleracea italica*), colza (*Brassica napus*), couve-flor (*Brassica oleracea botrytis*), mostarda branca (*Sinapis alba*), mostarda marrom (*Brassica juncea*), nabo (*Brassica rapa*), raiz forte (*Armoracia rusticana*), e repolho (*Brassica oleracea capitata*) (**Figura 6**).

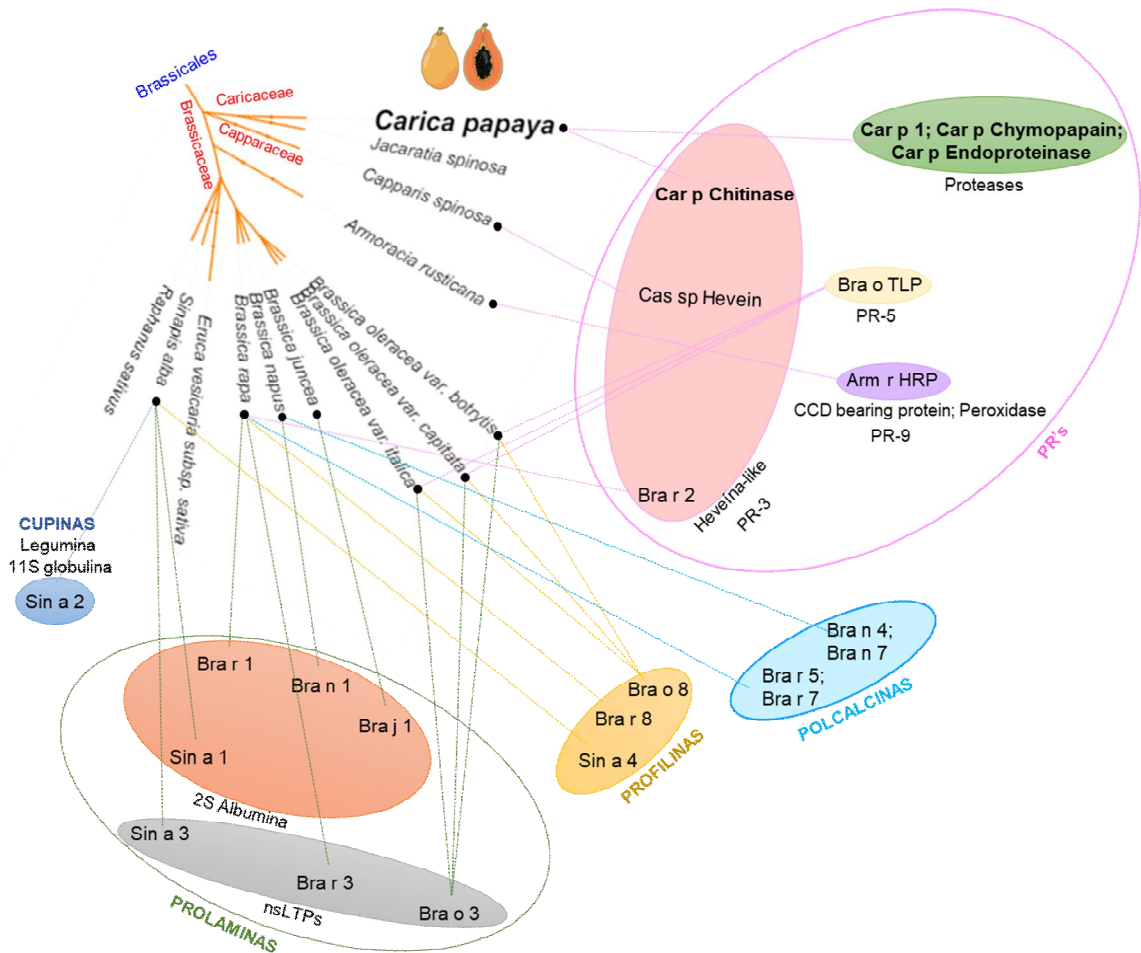
Assim, comparando os alérgenos já descritos para o mamão: *Car p Chitinase*, alérgeno pertencente à família PR-3, *Car p 1*, *Car p Chymopapain* e *Car p Endoproteinase*, pertencentes às famílias das proteases, as quais também são PR's, com os alérgenos já descritos para os alimentos próximos taxonomicamente deste alimento, foi possível formar a hipótese de que cupinas, prolaminas, profilinas, polcalcinas e outras PR's, como peroxidases, sejam potenciais alérgenos do mamão (**Figura 6**).

#### 4.1.3 Mandioca

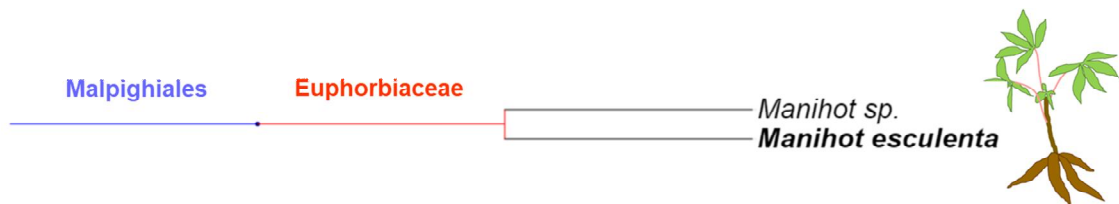
A mandioca (*Manihot esculenta*), como mostrado na árvore filogenética, pertence à ordem Malpighiales e família Euphorbiaceae (**Figura 7**). Através do levantamento taxonômico foi possível encontrar os alimentos que são mais próximos da mandioca: acerola (*Malpighia glabra*), linhaça (*Linum usitatissimum*), maracujá (*Passiflora edulis*) e murici (*Byrsonima crassifolia*), sendo que somente para o maracujá e acerola há alérgenos descritos na literatura (**Figura 8**).

Assim, comparando os alérgenos já descritos para a mandioca: *Man e FPA*, a qual é uma aldolase, e *Man e GAPDH*, as quais são enzimas, e *Man e 5*, que é uma *Hev b 5-like*, com os alérgenos já descritos para os alimentos próximos taxonomicamente deste alimento, foi possível formular a hipótese de que as

proteínas das famílias apontadas pela análise taxonômica, profilinas e PR's, estejam presentes também na mandioca (**Figura 8**).

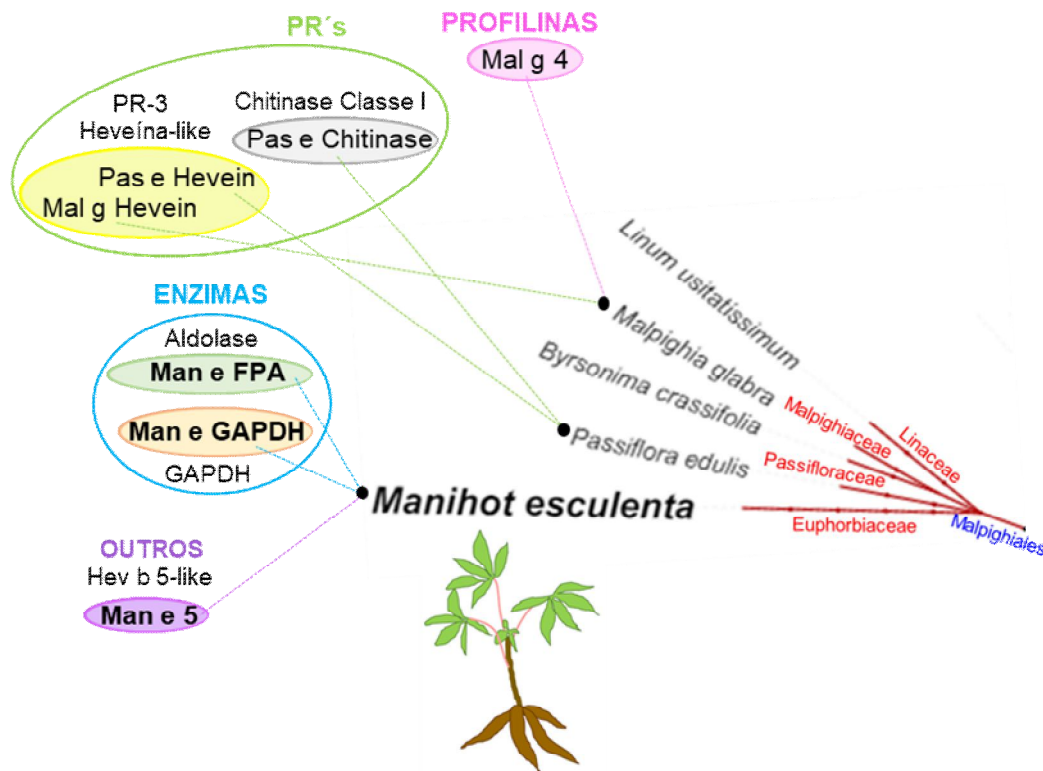


**Figura 6.** Árvore filogenética com indicação da ordem (Brassicales – em letras azuis) e famílias (letras vermelhas) do mamão (*Carica papaya* – em negrito) e de espécies taxonomicamente mais próximas a este, gerada com a ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator). Na figura também estão indicados, através de linhas pontilhadas coloridas, os alérgenos já descritos para o mamão (em negrito) e para cada um dos alimentos aparentados com este alimento (quando existentes). As famílias de alérgenos estão mostradas através de balões coloridos.



**Figura 7.** Árvore filogenética contendo as espécies do gênero *Manihot* (*Manihot sp.*) e a mandioca (*Manihot esculenta*), indicando a ordem (azul) e família (vermelho) deste alimento, gerada pela ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator).





**Figura 8.** Árvore filogenética com indicação da ordem (Malpighiales – em letras azuis) e famílias (letras vermelhas) da mandioca (*Manihot esculenta* – em negrito) e de espécies taxonomicamente mais próximas a esta, gerada com a ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator). Na figura também estão indicados, através de linhas pontilhadas coloridas, os alérgenos já descritos para a mandioca (em negrito) e para cada um dos alimentos aparentados com este alimento (quando existentes). As famílias de alérgenos estão mostradas através de balões coloridos.

#### 4.1.4 Manga

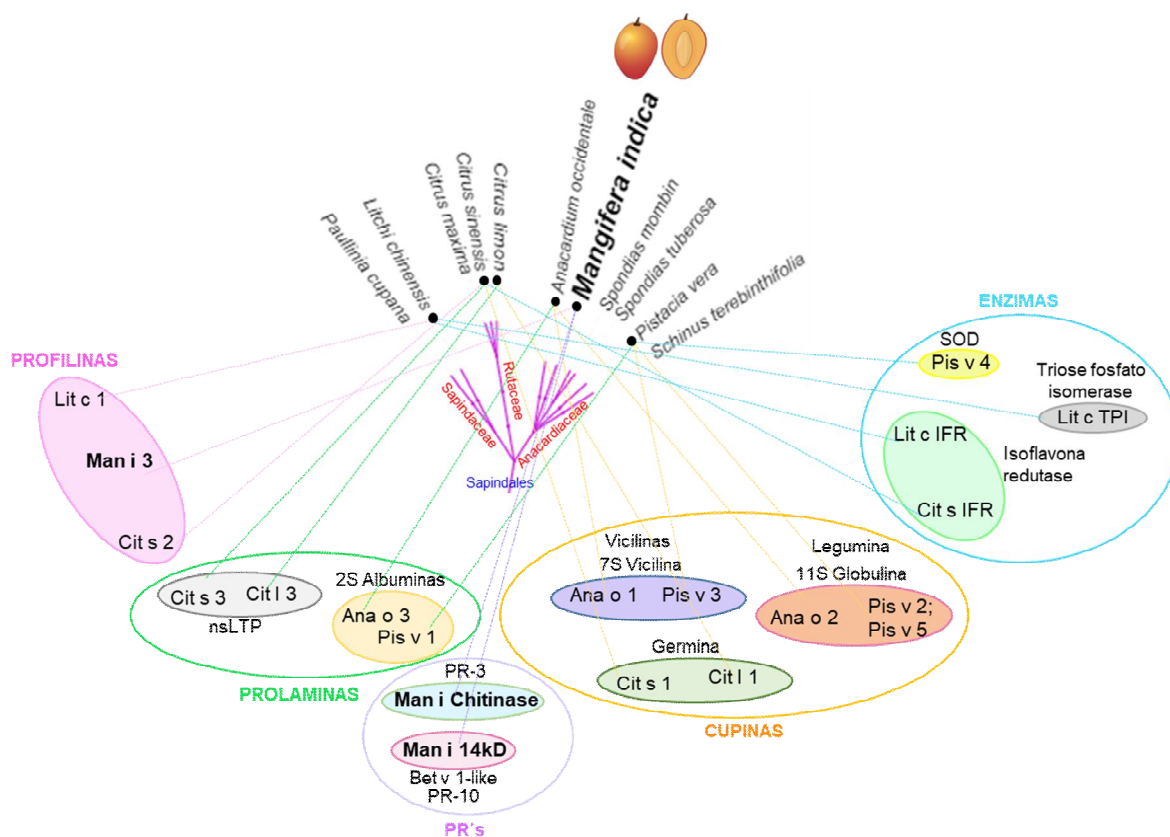
A manga (*Mangifera indica*) é um representante da ordem Sapindales e família Anacardiaceae (**Figura 9**), cujos alimentos taxonomicamente mais próximos são: cajá (*Spondias mombin*), caju (*Anacardium occidentale*), guaraná (*Paullinia cupana*), laranja (*Citrus sinensis*), lichia (*Litchi chinensis*), limão (*Citrus limon*), pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), pistache (*Pistacia vera*), pomelo (*Citrus maxi-*



**Figura 9.** Árvore filogenética contendo as espécies do gênero *Manihot* (*Manihot sp.*) e a mandioca (*Manihot esculenta*), indicando a ordem (azul) e família (vermelho) deste alimento, gerada pela ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator).

ma) e umbú (*Spondias tuberosa*), sendo que há relatos de alérgenos somente para o caju, lichia, limão, laranja e pistache (**Figura 10**).

A partir da **Figura 10**, é possível observar que apenas PR's (*Man i Chitinase* e *Man i 14kD*) e uma profilina (*Man i 3*) já foram descritas como alérgenos da manga. Desta forma, como cupinas, prolaminas e enzimas (redutases e isomerase) estão presentes nos alimentos mais aparentados, é possível que estas sejam de interesse para o estudo em manga, pois podem estar implicadas em alergias a esse alimento.



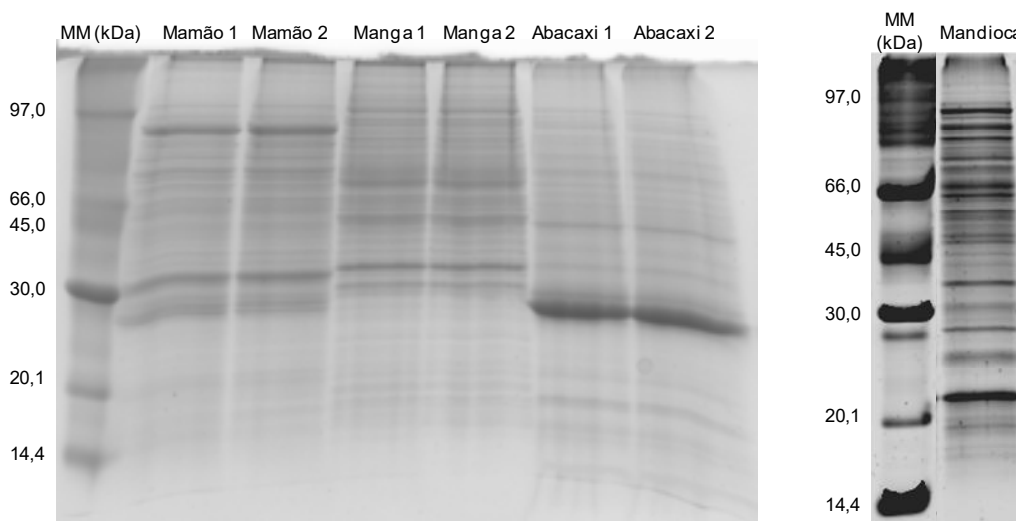
**Figura 10.** Árvore filogenética com indicação da ordem (Malpighiales – em letras azuis) e famílias (letras vermelhas) da mandioca (*Manihot esculenta* – em negrito) e de espécies taxonomicamente mais próximas a esta, gerada com a ferramenta phyloT (Phylogenetic Tree Generator). Na figura também estão indicados, através de linhas pontilhadas coloridas, os alérgenos já descritos para a mandioca (em negrito) e para cada um dos alimentos aparentados com este alimento (quando existentes). As famílias de alérgenos estão mostradas através de balões coloridos.

## 4.2 2-D Western Blotting

### 4.2.1 Qualidade do extrato proteico

Previamente à confecção dos géis 2-D para a realização do WB, os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para verificar a qualidade dos extratos.

Os perfis dos extratos proteicos visualizados por coloração com Azul de Coomassie coloidal revelaram bandas bem definidas, visíveis por toda extensão dos géis, mostrando a extração de proteínas de diversos tamanhos (**Figura 11**). Além disso, as extrações apresentaram boa reprodutibilidade e não foram observadas estrias verticais indesejáveis. Portanto, os extratos obtidos mostraram-se adequados para as análises posteriores.



**Figura 11.** Eletroforeses SDS-PAGE referentes à aplicação de 10  $\mu\text{g}$  de proteínas extraídas de cada um dos quatro alimentos estudados. Os números à esquerda das figuras correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os géis foram corados com Azul de Coomassie coloidal. Os números 1 e 2 ao lado dos nomes dos alimentos alergênicos são referentes à duplicata de extração proteica realizada para cada um dos alimentos alergênicos.

#### 4.2.2 Seleção dos *spots* de interesse

Para a identificação de proteínas IgE reativas aos soros dos pacientes alérgicos, foram realizadas eletroforeses 2-D em duplicata para os quatro alimentos analisados, sendo que um gel foi corado com Azul de Coomassie (Imagens não mostradas) e o outro teve as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose (**Figuras 12A – 15A**). Esta última foi incubada com os soros dos pacientes alérgicos para o devido reconhecimento de proteínas IgE reativas (**Figuras 12B – 15B**).

Nos perfis proteicos das eletroforeses 2-D das quatro amostras foi possível visualizar *spots* por toda a faixa de pH de 3 a 10 (**Figuras 12A – 15A**). Em relação à massa molecular, para o abacaxi, mamão e manga foram observados *spots* entre 180 e 10 kDa (**Figuras 12A, 13A e 15A**), e para a mandioca entre 180 e 15 kDa (**Figura 14A**).

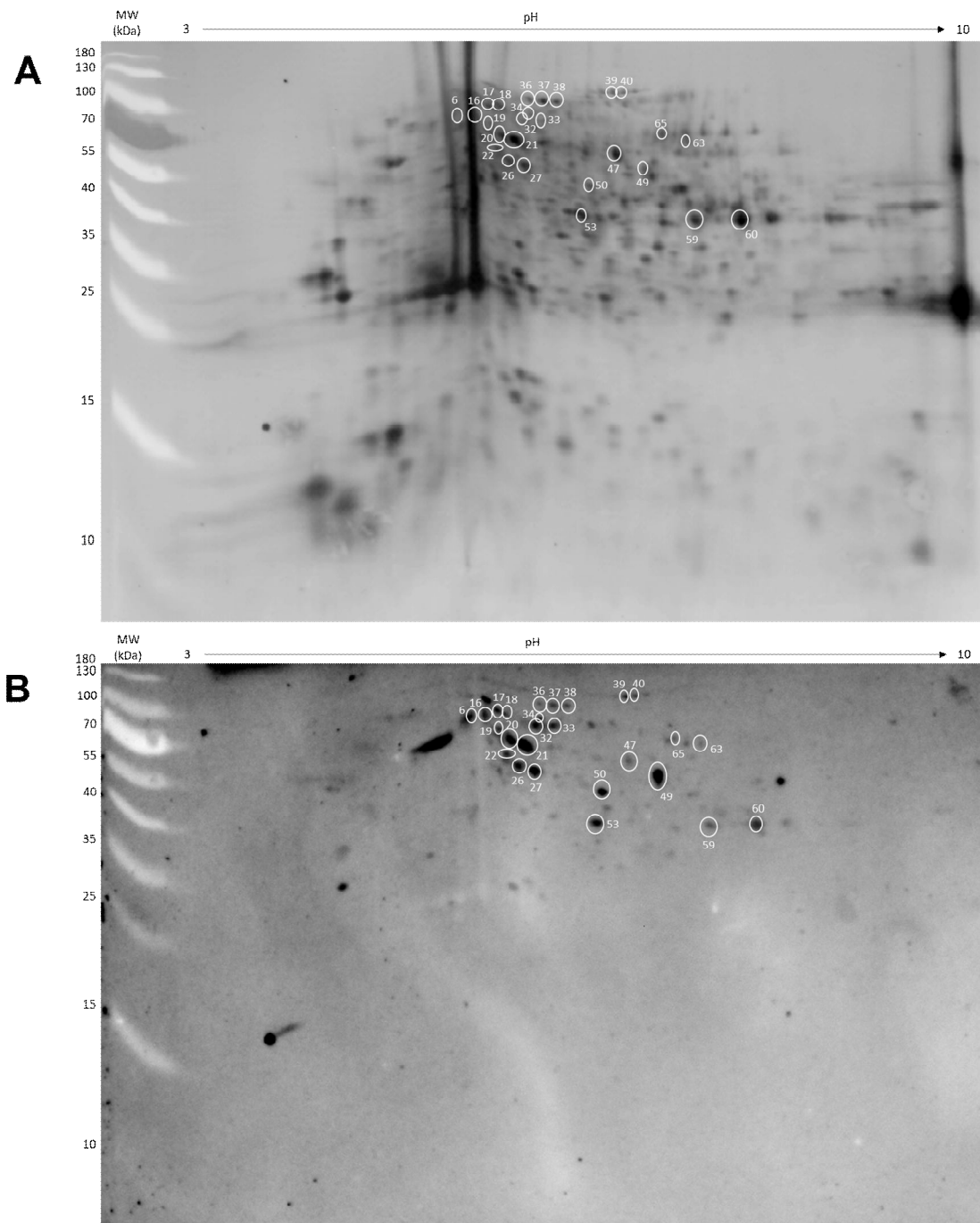
Após a transferência, as membranas foram coradas com *Deep Purple* (**Figuras 12A – 15A**) para proteínas totais, e foi realizado o registro das imagens, de modo que estas pudessem servir de referência na etapa de identificação dos *spots* reativos e sua correspondência com aqueles revelados no gel corado com Azul de *Coomassie* (Imagens não mostradas).

Para os *WB*, os quais foram realizados em duplicata para cada um dos alimentos, foram usados os soros de pacientes alérgicos de acordo com o que segue: para o abacaxi foi utilizado o soro de apenas um paciente alérgico (Paciente 1 – **Tabela 1**); para o mamão foi empregado um *pool* dos soros de dois pacientes (Pacientes 5 e 6); para a manga foi aplicado o soro de apenas um paciente (Paciente 3); para a mandioca foi usado o *pool* dos soros de cinco pacientes (Pacientes 8 ao 12).

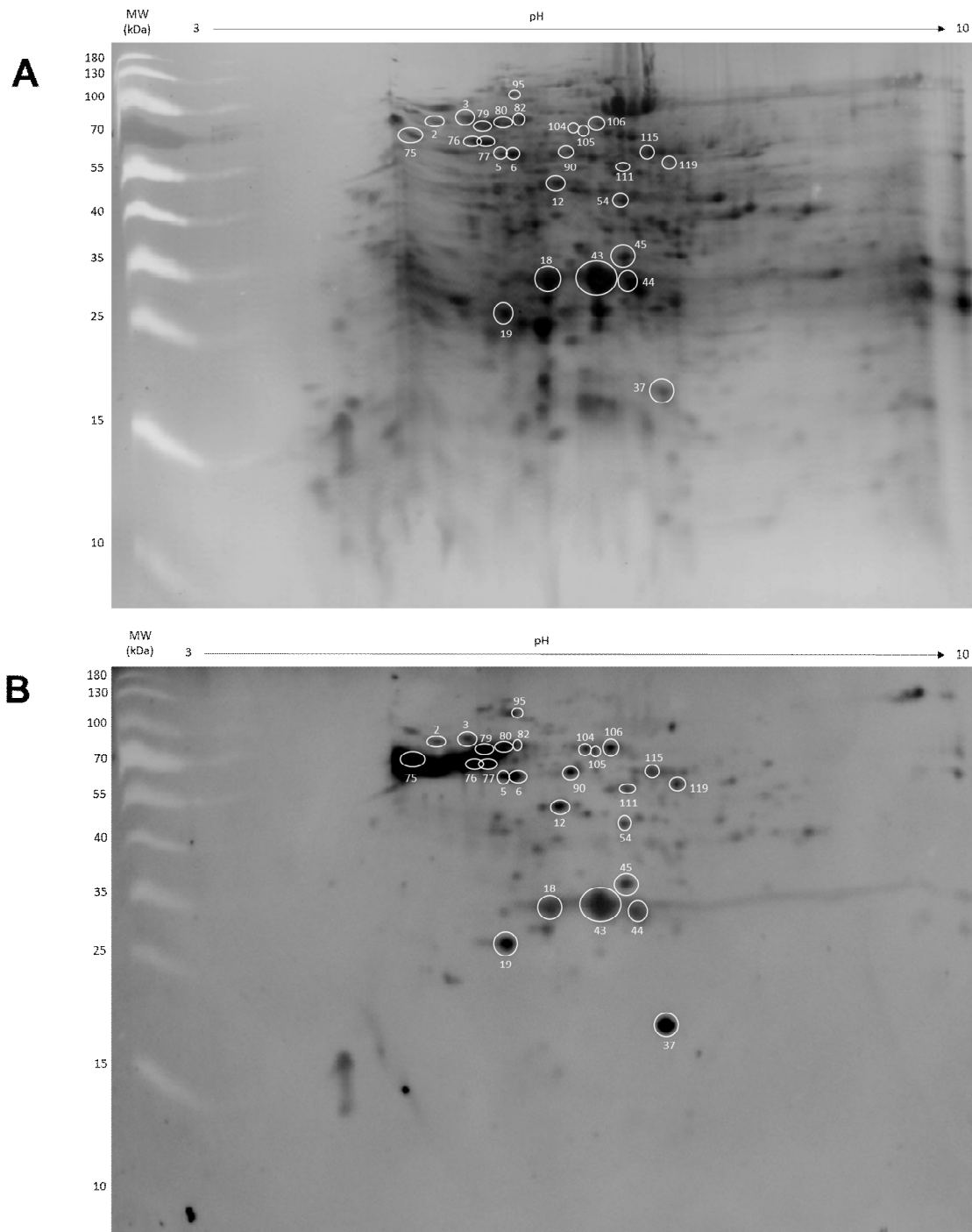
Após a revelação das membranas, para o abacaxi foram observadas proteínas IgE reativas principalmente na faixa de 180 a 35 kDa (**Figura 12B**), enquanto para o mamão e manga foram observadas proteínas na faixa de 180 a 25 kDa (**Figuras 13B e 15B**, respectivamente) e para a mandioca, na faixa de 180 a 40 kDa (**Figura 14B**). Desta maneira, a partir de comparação com os perfis proteicos das membranas coradas com *Deep Purple* foi possível selecionar quais *spots* seriam excisados dos géis corados com *Coomassie* para a posterior identificação por espectrometria de massa.

A partir das incubações com os soros dos pacientes foram selecionados 26 *spots* do perfil 2-D do extrato de abacaxi (**Figura 12**); 26 do de mamão (**Figura 13**); 27 do de mandioca (**Figura 14**) e 25 *spots* do perfil do extrato de manga (**Figura 15**).

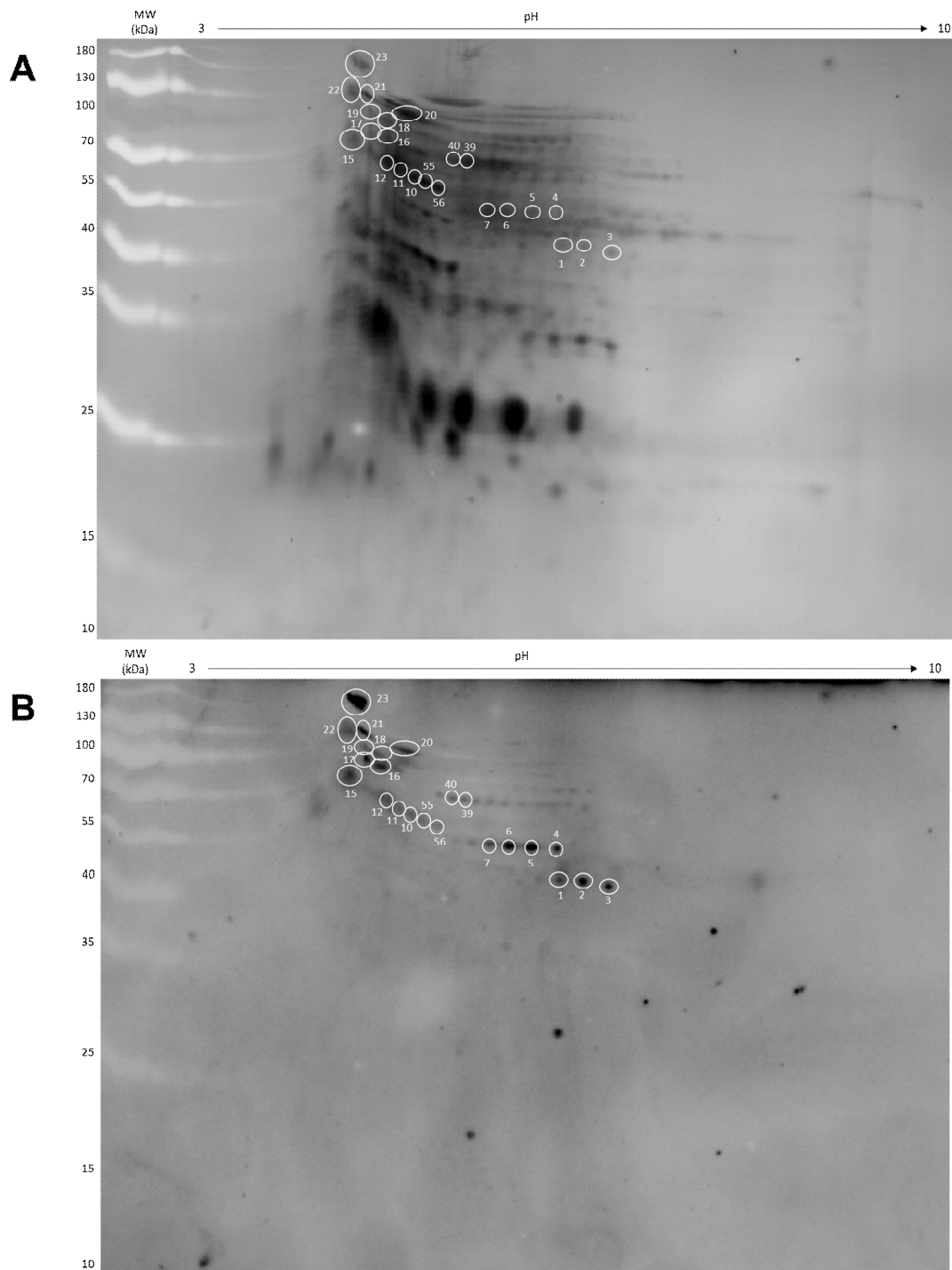
Nessa seleção foram priorizados os *spots* mais intensamente corados após a revelação da membrana e, também, aqueles que seriam mais facilmente isolados dos demais.



**Figura 12. A** - Membrana de nitrocelulose corada com *Deep Purple*, destinada ao *Western Blotting* (WB), após transferência de 50 µg de proteínas do abacaxi. **B** - Membrana de nitrocelulose referente ao WB para o abacaxi, a qual foi revelada com *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) e sua imagem obtida por quimioluminescência em sistema de fotodocumentação ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Foram utilizados 50 µg de proteínas do abacaxi, e o soro do paciente 1, alérgico a esse alimento, foi utilizado na diluição 1:10, sendo utilizado anticorpo secundário IgE *Goat Anti-Human pAb, HRP (Horseradish Peroxidase) Conjugate* (Invitrogen) na diluição 1:7500. Foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm (acima das imagens). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (MW), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os 26 spots circulado em branco são os que foram excisados do gel para a posterior identificação de suas proteínas por MS.

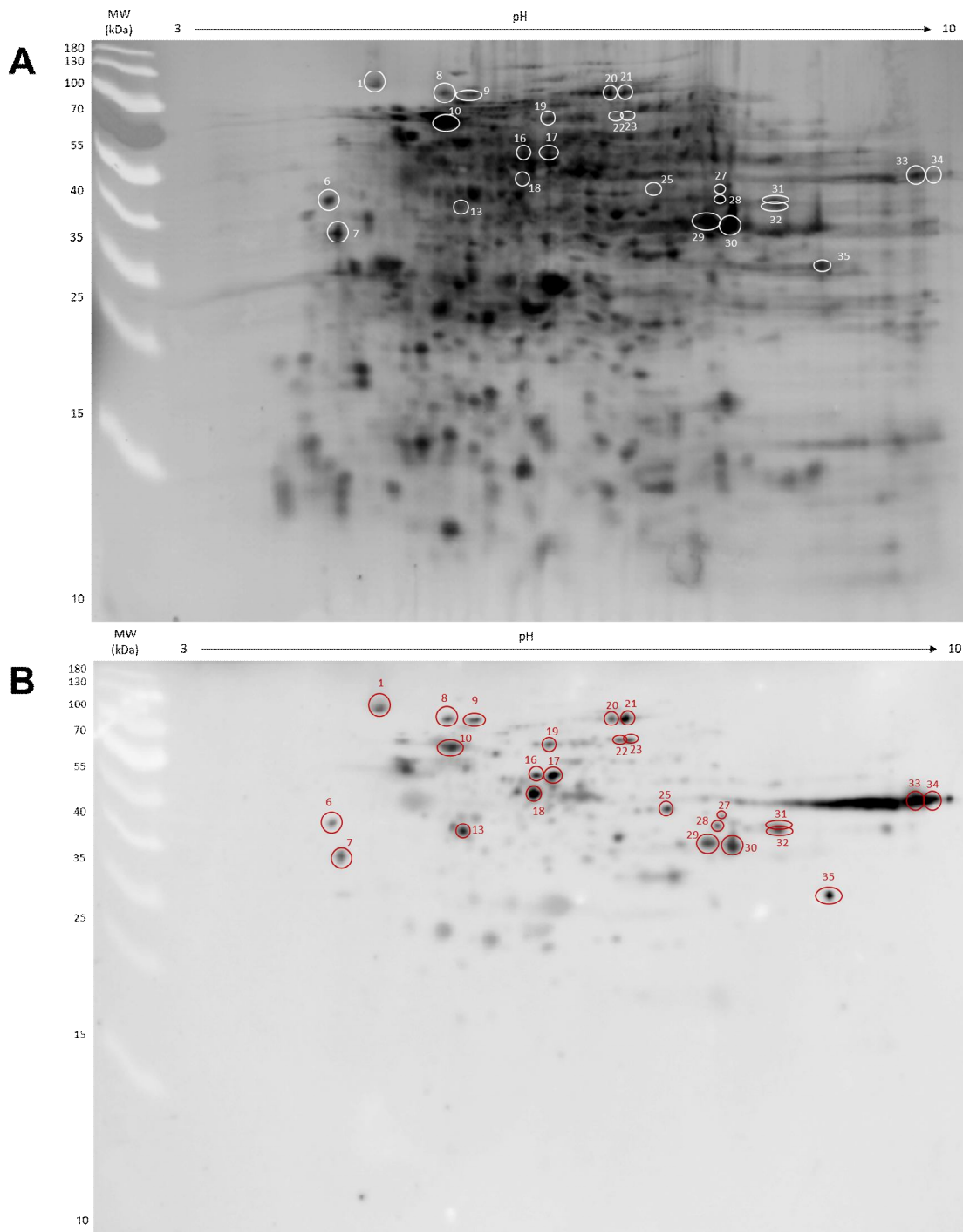


**Figura 13. A** - Membrana de nitrocelulose corada com *Deep Purple*, destinada ao *Western Blotting*, após transferência de 50  $\mu$ g de proteínas do mamão. **B** - Membrana de nitrocelulose referente ao *Western Blotting* para o mamão. A membrana foi revelada com *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) e sua imagem foi obtida por quimioluminescência em sistema de fotodocumentação *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare). Foram utilizados 50  $\mu$ g de proteínas do mamão e o pool dos soros dos pacientes 5 e 6, alérgicos ao mamão, foram utilizados na diluição 1:10, sendo utilizado anticorpo secundário IgE Goat Anti-Human pAb, HRP (Horseradish Peroxidase) Conjugate (Invitrogen) na diluição 1:7500. Foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm (acima das imagens). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (MW), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os 26 spots circulos em branco são os que foram excisados do gel para a posterior identificação de suas proteínas por MS.



**Figura 14.** **A** - Membrana de nitrocelulose corada com *Deep Purple* destinada ao *Western Blotting* (WB), após transferência de 50  $\mu$ g de proteínas da mandioca. **B** - Membrana referente ao WB para a mandioca revelada com *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare). Sua imagem foi obtida por quimioluminescência em sistema de fotodocumentação *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare). Foi utilizado o *pool* dos soros dos cinco pacientes alérgicos à mandioca (8-12) na diluição 1:10 e o anticorpo secundário *IgE Goat Anti-Human pAb, HRP (Horseradish Peroxidase) Conjugate* (Invitrogen) na diluição 1:7500. Foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm (acima das imagens). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os spots circulosados em branco são os que foram excisados do gel para a posterior identificação de suas proteínas por MS.





**Figura 15. A** - Membrana de nitrocelulose corada com *Deep Purple* destinada ao *Western Blotting* (WB), após transferência de 50 µg de proteínas da manga. **B** - Membrana referente ao WB para a manga, a qual foi revelada com *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare), sendo a imagem obtida por quimioluminescência em sistema de fotodocumentação *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare). Foram utilizados o soro do paciente alérgico à manga (3) na diluição 1:10, e o anticorpo secundário *IgE Goat Anti-Human pAb, HRP* (Horseradish Peroxidase) *Conjugate* (Invitrogen) na diluição 1:7500. A tira de pH 3-10, 7 cm (acima das imagens). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os spots circulado em branco e vermelho são os que foram excisados do gel para a posterior identificação de suas proteínas por MS.



Para cada um dos quatro alimentos alergênicos foram utilizados para a excisão dos *spots*, além dos dois géis espelho (contendo 50 µg de proteínas), mais seis géis preparativos confeccionados com 100 µg de proteínas (Não mostrados), perfazendo o total de oito géis.

#### 4.2.3 Identificação das proteínas presentes nos *spots* de interesse

Conforme apresentado nas **Tabelas 2-5 (Apêndice A)**, foram identificadas proteínas em todos os 104 *spots*. Além disso, observou-se que muitas vezes mais de uma proteína foi identificada em um mesmo spot. Os acessos às sequências de proteínas não foram mostrados nas tabelas devido ao pedido de patente juntamente à Agência USP de Inovação (AUSPIN), o que justifica a defesa de tese fechada.

Como pode ser verificado na **Tabela 2 (Apêndice A)**, em relação ao **abacaxi**, as proteínas *ATP synthase* (*spots* 6, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, e 32); *heat shock protein* (*spots* 16, 17, 18, 19, 20, 32 e 50); *enolase* (*spots* 17, 19, 20, 21, 22, 26, 27, 32, 33 e 34); *phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein* (*spots* 33 e 34); *tolB protein-related* (33, 34, 36 e 37); *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase* (*spots* 36, 37 e 38); *purple acid phosphatases superfamily protein* (*spots* 37, 38 e 65); *aconitase 3* (*spots* 39 e 40); *peroxidase superfamily protein* (*spots* 47, 49, 50, 59 e 60); *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2* (*spots* 53, 59, 60, 63 e 65) e *aldolase superfamily protein* (*spots* 59 e 60) foram identificadas em mais de um spot. Também na **Tabela 2 (Apêndice A)** podemos observar que das famílias de proteínas identificadas para o abacaxi, sete foram coincidentes com as levantadas através da similaridade taxonômica (**Figura 4**): *enolase* (Enzimas), *glyoxalase family protein* (Enzimas), *purple acid phosphatases superfamily protein* (Enzimas), *peroxidase superfamily protein* (PRs), *leucine-rich repeat (LRR) family protein* (Outras), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2* (Enzimas) e *polygalacturonase* (Enzimas).

No caso do **mamão (Tabela 3, Apêndice A)**, também foram identificadas as mesmas proteínas em mais de um spot como observado para *heat shock protein* (*spots* 2, 3, 5, 6, 54, 75, 76, 77, 79, 80 e 82); *enolase* (*spots* 5 e 6); *ATP synthase* (*spots* 5, 6 e 95); *S-adenosylmethionine synthetase 2* (*spots* 12 e 18); *peroxidase* (*spots* 18, 19, 37 e 43); *Cysteine proteinases superfamily protein* (*spots* 12 e 18);

*glutathione S-transferase* (spots 19 e 43); *HXXXD-type acyl-transferase family protein* (spots 43, 44, 45 e 115); *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase* 32 (spots 45 e 54); *Cytosol aminopeptidase family protein* (spots 90 e 95); *SDH1-1 succinate dehydrogenase 1-1* (spots 104 e 105) e *cell wall invertase 2* (spots 105 e 106). Dentre as famílias de proteínas identificadas para o mamão, sete foram coincidentes com as levantadas através da similaridade taxonômica (**Figura 6**): *Cysteine proteinases superfamily protein* (família das PRs), *peroxidase* (família das PRs), *thioredoxin superfamily protein* (família das PRs), *pathogenesis-related family protein* (PR), *peroxiredoxin* (família das PRs), *GLP10 germin-like protein 10* (família das Cupinas) e *protease* (família das PRs).

Vale observar que *cysteine proteinases* Car p 1 (papain) e Car p Chymopapain já são alérgenos do mamão ([www.allergome.org](http://www.allergome.org)), como mostrado na **Figura 6**, porém, as outras duas *cysteine proteinases* identificadas neste trabalho possuem sequências diferentes da papaína (*papain*) e quimopapaína (*chymopapain*), podendo ser outros potenciais alérgenos desse fruto.

No caso da **mandioca (Tabela 4, Apêndice A)** foram detectadas em mais de um spot as proteínas: *NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein* (spots 1 e 2); *aldolase* (1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12 e 15); *peroxidase* (spots 1, 2, 3, 4 e 5); *serine protease inhibitor (SERPIN) family protein* (spots 1, 2 e 5); *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (spots 4 e 5); *phosphoglycerate kinase* (spots 6 e 7); *RmlC-like cupins superfamily protein* (spots 6 e 7); *protease* (spots 6, 7 e 18); *thioredoxin family protein* (spots 7 e 18); *actin* 7 (spots 10, 11, 15, 55 e 56); *cold-regulated 47* (spots 11 e 12); *tubulin beta 8* (spots 16 e 17); *PDI-like 1-1* (spots 18 e 19); *heat shock protein* (spots 19, 20, 21, 22, 51, 52, 53 e 54); *cytosol aminopeptidase family protein* (spots 39 e 40); *enolase* (spots 39 e 40) e *UDP-glucose pyrophosphorylase 2* (spots 39 e 40). Dentre as famílias de proteínas identificadas para a mandioca, seis foram coincidentes com as levantadas através da similaridade taxonômica (**Figura 8**): *aldolase* (Enzimas); *peroxidase* (família das PRs); *serine protease inhibitor (SERPIN) family protein* (família das PRs); *protease* (família das PRs); *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Enzimas) e *thioredoxin* (família das PRs).

A *aldolase* Man e FPA já foi identificada e descrita para a mandioca (SANTOS et al., 2011), porém, outros tipos de aldolases foram identificadas neste

trabalho. Apesar da *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* Man e GAPDH já ter sido identificada como alérgeno anteriormente (SANTOS et al., 2011), neste trabalho foram identificados outros tipos desta mesma proteína. Por outro lado, apesar da *RmlC-like cupins superfamily protein* não ter sido apontada pelo levantamento por similaridade taxonômica, pode ser um potencial alérgeno da mandioca, já que proteínas dessa superfamília são alérgenos bastante comuns em outros alimentos (RADAUER; BREITENEDER, 2007).

Da mesma forma como observado para os outros três alimentos, para a **manga, Tabela 5 (Apêndice A)**, foram identificadas em mais de um spot as proteínas: *uncharacterized protein OS Citrus clementina GN CICLE v10000682mg PE* (spots 1, 7 e 22); *uncharacterized protein OS Citrus sinensis GN CISIN 1g008033mg PE* (spots 1, 8 e 20); *actin* (spots: 6, 9, 10, 13, 16, 27 e 31); *small GTP Rab GDI* (spots 16, 17, 18 e 19); *3 ketoacyl CoA thiolase B partial* (spots 27, 28, 30, 31, 32, 33 e 34) e *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase* (spots 27, 28 e 29). Em contraste com os demais alimentos estudados, para a manga não foram observadas proteínas coincidentes entre o 2-D WB e a similaridade taxonômica. Porém, a proteína *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase*, que foi identificada em três spots, pode ser uma provável proteína alergênica da manga, pois é um potencial alérgeno para o abacaxi (**Tabela 2 - Apêndice A**) e um alérgeno já descrito para a mandioca (**Tabela 4 - Apêndice A**).

### 4.3 Expressão recombinante

#### 4.3.1 Sequências de genes selecionadas para a expressão em *Pichia pastoris*

As sequências de genes das proteínas potencialmente alergênicas referentes ao abacaxi, mamão, mandioca e manga foram escolhidas por comparação entre as proteínas IgE reativas identificadas pela técnica *2-D Western Blotting* e pela análise *in silico*, através da similaridade com espécies taxonomicamente mais próximas. Além disso, a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) foi utilizada para confirmar se as proteínas selecionadas estavam presentes nos alimentos alergênicos em estudo, facilitando a identificação de novos alérgenos.

Como mostra a **Tabela 6**, foram selecionadas quatro sequências de genes referentes ao abacaxi: enolase 1, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase C2, repetição rica em leucina (LRR) e peroxidase; cinco do mamão: ascorbato peroxidase 2, germina-like, proteína relacionada à patógeno, peroxirredoxina 2F, tiorredoxina; seis da mandioca: alfa/beta-hidrolase, glioxalase, oxirredutase ligada ao NAD(P), cupina e proteína inibidora de serina protease (SERPINA); e quatro da manga: álcool desidrogenase; 3-cetoacil CoA tiolase B, pequena GTP Rab GDI, homocisteína S-metiltransferase.

**Tabela 6.** Sequências selecionadas para a expressão em *Pichia pastoris* (continua).

<b>Ananas comosus (abacaxi)</b>			
<b>Proteína / Família</b>	<b>In silico Alimento / Alérgeno (Allergome) / Família</b>	<b>2-D WB</b>	<b>Proteína encontrada através do BLAST</b>
<b>Enolase 1 / Enzima</b>	Zea mays (milho) / Zea m 22 / Enolase / Enzima	Spots A21 e A26	Sim
<b>Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase C2/GAPDH/ Enzima</b>	Triticum aestivum (trigo) / Tri a 34 / GAPDH / Enzima	Spots A53, A59, A60, A63 e A65	Sim
<b>Repetição rica em leucina (LRR) / Outra</b>	Triticum aestivum (trigo) / Tri a 23kd / LRR / Outra	Spot A50	Sim
<b>Peroxidase / Peroxidase / PR-9 / PR</b>	Triticum aestivum (trigo) / Tri a Peroxidase / PR-9 / PR	Spots A47, A49, A5, A59 e A60.	Sim
<b>Carica papaya (mamão)</b>			
<b>Proteína / Família</b>	<b>In silico Alimento / Alérgeno (Allergome) / Família</b>	<b>2-D WB</b>	<b>BLAST</b>
<b>Ascorbato peroxidase 2 / Peroxidase / PR-9 / PR</b>	<i>Armoracia rusticana</i> (raiz-forte) / Arm r HRP / Peroxidase / PR-9 (PR)	Spots M18, M19 e M43.	Não
<b>Germina-like / Germina / Cupina</b>	<i>Sinapsis alba</i> (mostarda branca) / Sin a 2 / 11S globulina / Legumina / Cupina	Spot M44	Não
<b>Proteína relacionada à patógeno / PR</b>	<i>Brassica oleracea</i> (brócolis, repolho, couve-flor) / Bra o TLP / PR-5 / PR; <i>Armoracia rusticana</i> (raiz-forte) / Arm r HRP / Peroxidase / PR-9 / PR.	Spot M19	Não
<b>Peroxirredoxina 2F / PR-9 / PR</b>	<i>Armoracia rusticana</i> (raiz-forte) / Arm r HRP / Peroxidase / PR-9 / PR.	Spot M37	Não
<b>Tiorredoxina / PR-9 / PR</b>	<i>Armoracia rusticana</i> (raiz-forte) / Arm r HRP / Peroxidase / PR-9 / PR.	Spot M18	Não

**Tabela 6.** Sequências selecionadas para a expressão em *Pichia pastoris* (conclusão).

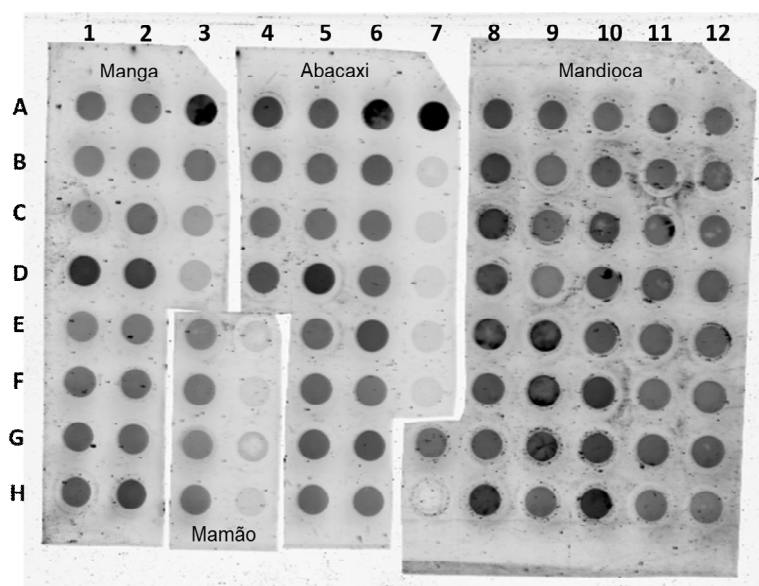
<b><i>Mangifera indica</i></b> <b>(manga)</b>			
<b>Proteína / Família</b>	<b><i>In silico</i></b> <b>Alimento / Alérgeno (Allergome) /</b> <b>Família</b>	<b>2-D WB</b>	<b>Proteína encontrada através do BLAST</b>
<b>Alcool desidrogenase</b>	Não	Spot G25	Não
<b>3-cetoacil CoA tiolase B</b>	Não	Spots G27, G28, G30, G31, G32, G33 e G34.	Não
<b>Pequena GTP Rab GDI</b>	Não	Spots G16, G17, G18 e G19.	Não
<b>Proteína não caracterizada OS Citrus clementina GN CICLE v10018965mg PE 3 SV 1 (homocisteína S-metiltransferase)</b>	Não	Spot G22	Não
<b><i>Manihot esculenta</i></b> <b>(mandioca)</b>			
<b>Proteína / Família</b>	<b><i>In silico</i></b> <b>Alimento / Alérgeno (Allergome) /</b> <b>Família</b>	<b>2-D WB</b>	<b>BLAST</b>
<b>Alfa/beta-Hidrolase / Enzima</b>	Alérgeno já descrito para outros alimentos	Spot D20	Sim
<b>Glioxalase / Enzima</b>	Alérgeno já descrito para outros alimentos	Spots D10 e D11	Sim
<b>Oxirredutase ligada ao NAD (P) / Enzima</b>	Alérgeno já descrito para outros alimentos	Spots D1, D2, D3, D4, D5 e D6	Sim
<b>RmIC-like cupina / Cupina</b>	Alérgeno já descrito para outros alimentos	Spots D6 e D7	Sim
<b>Inibidor de serina protease (SERPINA) / Inibidor de protease / PR</b>	<i>Malpighia glabra</i> (acerola) / Mal g Hevein / Heveína-like; Proteínas ligadas à quitina/ PR-3 / PR; <i>Passiflora edulis</i> (maracujá) / Pas e Hevein / Heveína-like / PR-3 / PR; <i>Passiflora edulis</i> (maracujá) / Pas e Chitinase / Quitinase Classe I / PR-3 / PR	Spots D1, D2, D5, D6 e D7	Sim
<b>Tiorredoxina / PR-9 / PR</b>	<i>Malpighia glabra</i> (acerola) / Mal g Hevein / Heveína-like; Proteínas ligadas a quitina/ PR-3 / PR; <i>Passiflora edulis</i> (maracujá) / Pas e Hevein / Heveína-like / PR-3 / PR; <i>Passiflora edulis</i> (maracujá) / Pas e Chitinase / Quitinase Classe I / PR-3 / PR	Spots D7 e D18	Sim

### 4.3.2 Confirmação da expressão das proteínas de interesse e seleção dos melhores clones

Para confirmar a correta expressão de proteínas pelos clones de *Pichia* e escolher os melhores clones, *Dot blots* foram confeccionados. A **Figura 16** mostra as 4 membranas de PVDF referentes aos 4 alimentos alergênicos em estudo antes do bloqueio, contendo no total somente 11 das 19 proteínas potencialmente alergênicas expressas por *Pichia pastoris*, secretadas por diferentes clones para a mesma proteína.

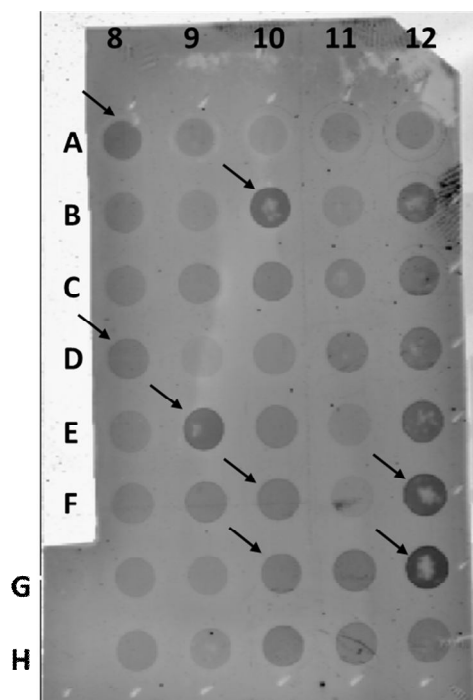
Como exemplo, a **Figura 17** mostra a membrana depois da hibridização realizada com a mistura dos soros dos 5 pacientes alérgicos à mandioca (1:10) (**Tabela 1**), contendo 4 das 6 potenciais proteínas alergênicas desse alimento, mostrando que todos os potenciais alérgenos secretados pela *Pichia* incluídos na membrana reagiram aos soros.

Ainda na **Figura 17**, as setas indicam que dois clones foram escolhidos em relação a cada potencial alérgeno de acordo com as intensidades dos *spots*. Assim, os *spots* mais escuros foram selecionados para a etapa de expressão em maior escala. O mesmo procedimento foi realizado para todas as 19 proteínas potencialmente alergênicas, e todos os 19 potenciais alérgenos secretados pela *Pichia* reagiram aos seus respectivos soros (dados não mostrados).



**Figure 16.** Quatro membranas de PVDF antes do bloqueio referentes aos quatro alimentos em estudo, contendo 11 proteínas secretadas pela *Pichia pastoris*: **Manga** - Proteína não caracterizada

OS Citrus clementina GN CICLE v10018965mg PE 3 SV 1 (homocisteína S-metiltransferase) (A1-D1); Pequena GTP Rab GDI (E1-H1); 3-cetoacil CoA tiolase B (A2-H2 e A3-B3); **Mamão** - Peroxirredoxina 2F (E3-H3); **Abacaxi** - Enolase 1 (A4-D4 e A5-F5); Peroxidase (G5-H5 e A6-C6); Repetição rica em leucina (LRR) (D6-H6; 7A); **Mandioca** - Glioxalase (A8-H8; A9-B9); Alfa/beta-Hidrolase (C9-H9; A10-D10); Inibidor de serina protease (SERPINA) (E10-H10; A11-F11); Tiorredoxina (G11-H11; A12-H12). **Controles negativos** - anticorpo específico para o alérgeno de noz: C3, G4, B7, G7; anticorpo específico para o alérgeno de amêndoa: D3, H4, C7, H7; **PBS**: E4, F4, D7-F7. Todas as membranas foram reveladas usando o Typhoon Scanner (*photo-multiplier tube* – PMT: 550).



**Figura 17.** Membrana referente à quatro potenciais alérgenos de mandioca (Glioxalase: A8-H8; A9-B9; Alfa/beta-Hidrolase: (C9-H9; A10-D10); Inibidor de serina protease (SERPINA): E10-H10; A11-F11; e Tiorredoxina: G11-H11; A12-H12) depois da hibridização. **Controles negativos** - anticorpo específico para o alérgeno de noz: G7; anticorpo específico para o alérgeno de amêndoa: H7. Foi utilizada a mistura de soros dos 5 pacientes alérgicos à mandioca (1:10). A membrana foi revelada usando o Typhoon Scanner (PMT: 550). As setas indicam os clones selecionados para os potenciais alérgenos de mandioca.

Para os *Dot Blots*, conforme informado anteriormente, dois controles negativos foram utilizados: anticorpos específicos para as proteínas alergênicas de noz e amêndoa, produzidos e disponibilizados por um grupo espanhol da *Universidad Complutense de Madrid*. Porém, para as próximas etapas, foi selecionado o anticorpo específico de amêndoa (pMJA 181), como controle negativo.

Além dos *Dot Blots*, para a confirmação da expressão das 19 proteínas de interesse, foi realizado o sequenciamento dos peptídeos presentes nos extratos de proteínas secretadas pela *Pichia pastoris* através da MS, conforme já informado.

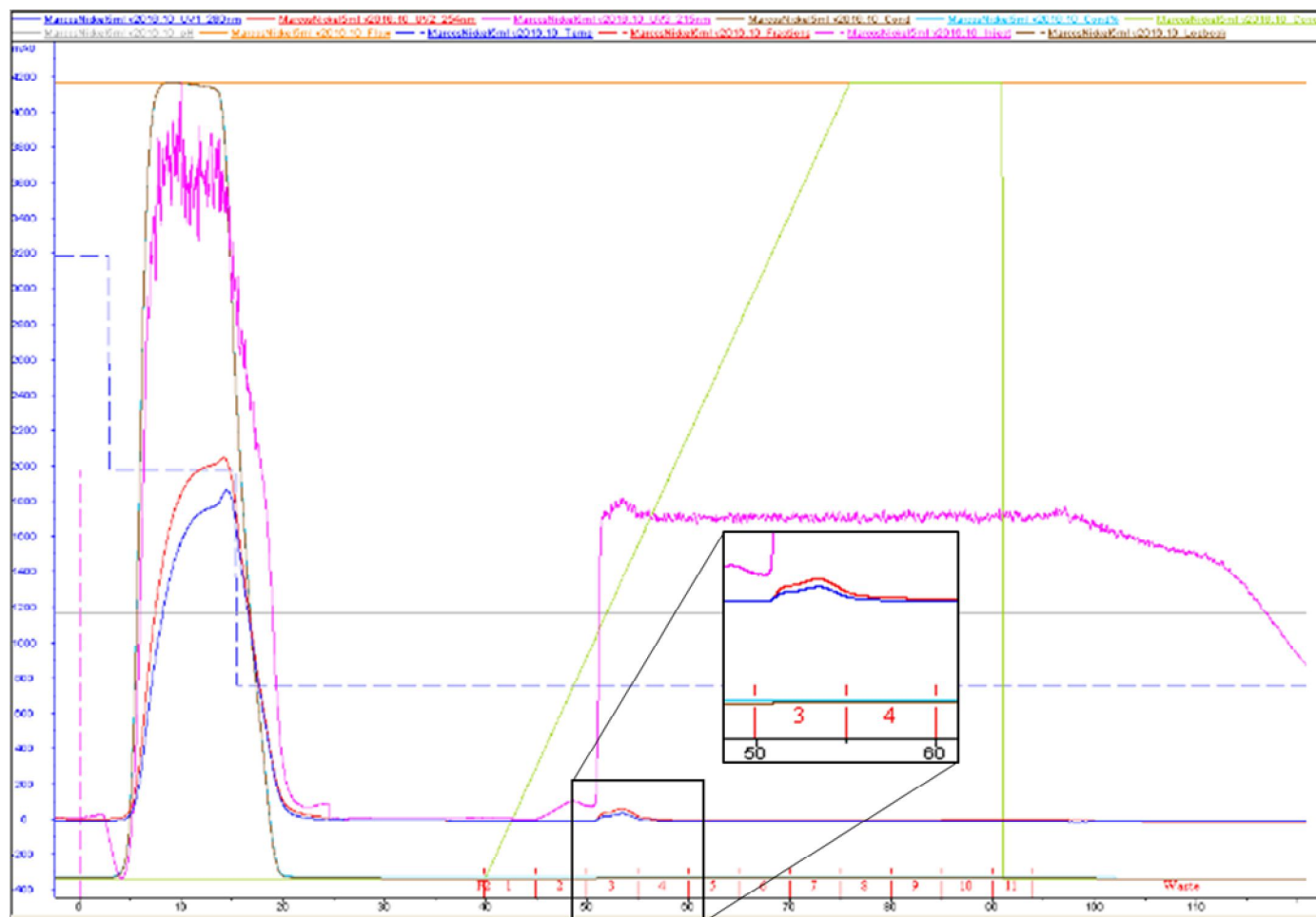
Cada resultado referente ao sequenciamento de cada um dos 19 extratos contendo os potenciais alérgenos foi comparado a sua respectiva sequência de proteína recombinante madura, o que resultou em coberturas de sequência entre 74,5% e 96,4%, confirmando a expressão de todas as 19 proteínas alergênicas em estudo (dados não mostrados).

#### 4.3.3 Purificação dos potenciais alérgenos

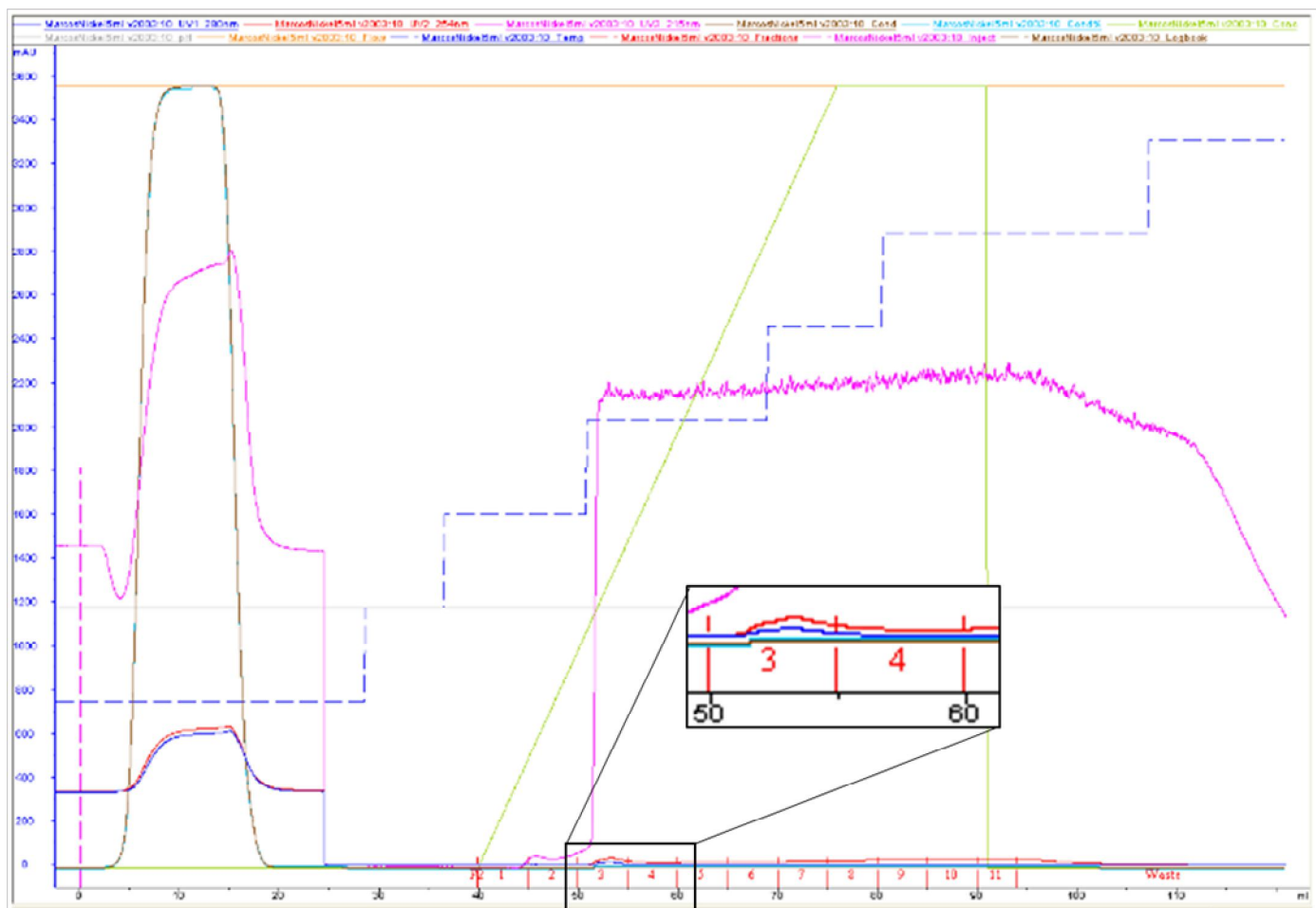
Após a expressão em *Pichia pastoris* dos potenciais alérgenos em maior escala, as 19 proteínas de interesse e o anticorpo específico do alérgeno de amêndoa (controle negativo) foram separadas das demais proteínas usando diferentes colunas e equipamentos, conforme já descrito (Item 3.2.3.9). Após testes, foi decidido utilizar o sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL. Os sobrenadantes liofilizados contendo as proteínas secretadas pela *Pichia* foram dissolvidos em 5 M ureia e o tampão de eluição usado foi 5 M ureia contendo 400 mM de imidazol, a um fluxo de 3mL/min, com exceção da cupina de mandioca, para a qual foram utilizados 100 mM de imidazol.

As **Figuras 18, 19, 20 e 21** mostram, respectivamente, os cromatogramas referentes à purificação das proteínas: repetição rica em leucina (LRR) de abacaxi, proteína relacionada à patógeno de mamão, oxidoredutase ligada ao NAD (P) de mandioca e homocisteína S-metiltransferase de manga, em sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL e 5 M de ureia. Como observado nas **Figuras 18-21**, os picos obtidos foram encontrados entre as frações coletadas 3 e 4 (entre 50-60 min). Para alguns potenciais alérgenos, dois picos foram gerados. Incluindo o controle negativo anticorpo específico para o alérgeno de amêndoa, 20 proteínas foram separadas sob as condições citadas acima, e assim, 20 gráficos foram obtidos (os outros 16 gráficos não foram mostrados).

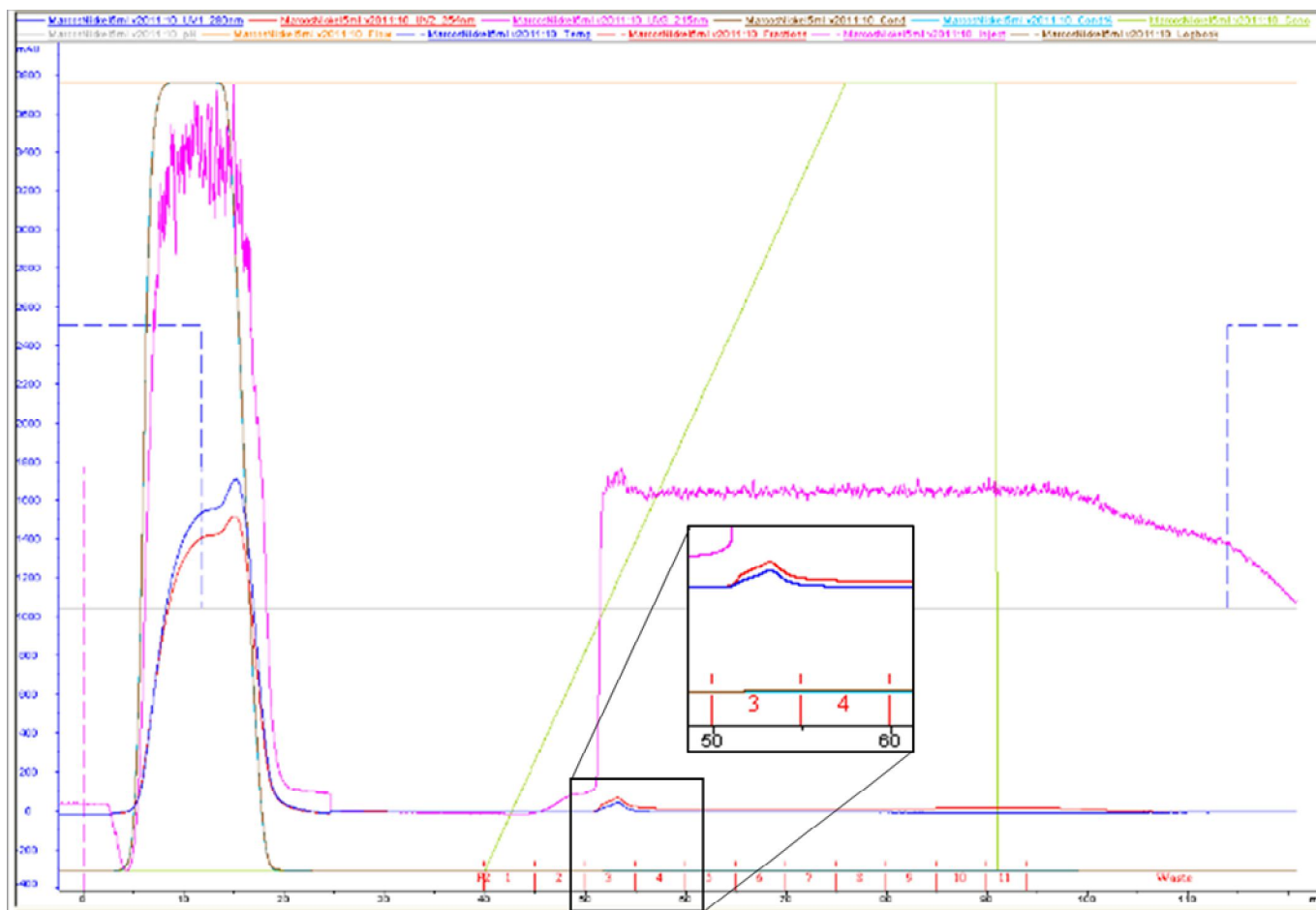




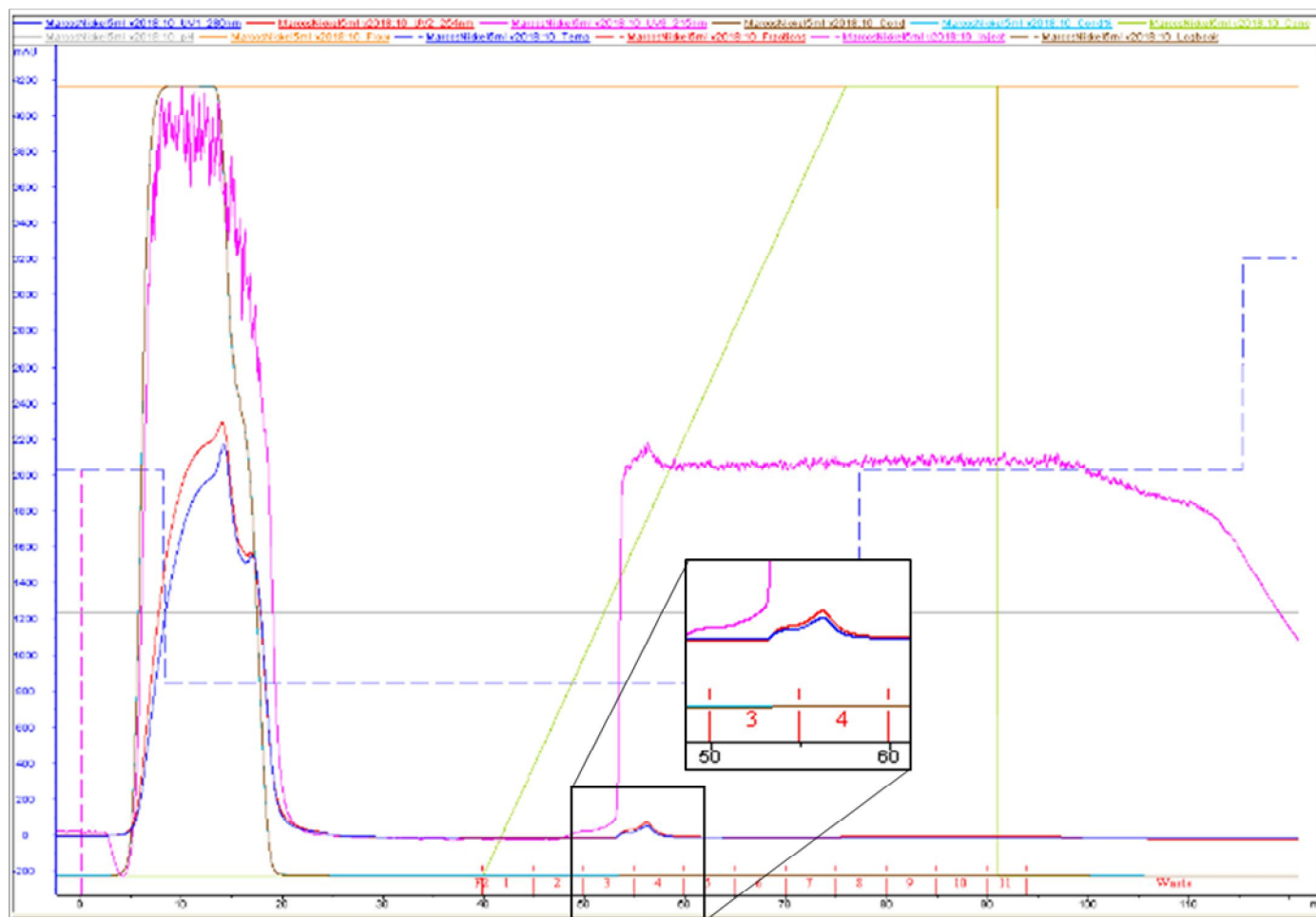
**Figura 18.** Cromatograma referente à purificação do potencial alérgeno repetição rica em leucina (LRR) de abacaxi. O sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL foi utilizado. O sobrenadante contendo as proteínas secretadas pela *Pichia* foram dissolvidos em 5 M de ureia e foi usado 5 M de ureia contendo 400 mM de imidazol como tampão de eluição. O pico pôde ser observado entre as frações 3 e 4 coletadas (entre 50 e 60 min), conforme destacado no gráfico através de retângulos. O retângulo maior mostra o pico indicado dentro do retângulo menor, aumentado. Eixo x: tempo de eluição (min). Eixo y: absorbância a 280 nm (mAU). Linha azul não tracejada: 280 nm. Linha vermelha: 254 nm. Linha rosa: 215 nm.



**Figura 19.** Cromatograma referente à purificação do potencial alérgeno proteína relacionada à patógeno (PR) de mamão. O sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL foi utilizado. O sobrenadante contendo as proteínas secretadas pela *Pichia* foram dissolvidos em 5 M de ureia e foi usado 5 M de ureia contendo 400 mM de imidazol como tampão de eluição. O pico pôde ser observado entre as frações 3 e 4 coletadas (entre 50 e 60 min), conforme destacado no gráfico através de retângulos. O retângulo maior mostra o pico indicado dentro do retângulo menor, aumentado. Eixo x: tempo de eluição (min). Eixo y: absorbância a 280 nm (mAU). Linha azul não tracejada: 280 nm. Linha vermelha: 254 nm. Linha rosa: 215 nm.



**Figura 20.** Cromatograma referente à purificação do potencial alérgeno oxidorreductase ligada ao NAD (P) de mandioca. O sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL foi utilizado. O sobrenadante contendo as proteínas secretadas pela *Pichia* foram dissolvidos em 5 M de ureia e foi usado 5 M de ureia contendo 400 mM de imidazol como tampão de eluição. O pico pôde ser observado entre as frações 3 e 4 coletadas (entre 50 e 60 min), conforme destacado no gráfico através de retângulos. O retângulo maior mostra o pico indicado dentro do retângulo menor, aumentado. Eixo x: tempo de eluição (min). Eixo y: absorbância a 280 nm (mAU). Linha azul não tracejada: 280 nm. Linha vermelha: 254 nm. Linha rosa: 215 nm.



**Figura 21.** Cromatograma referente à purificação do potencial alérgeno homocisteína S-metiltransferase de manga. O sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL foi utilizado. O sobrenadante contendo as proteínas secretadas pela *Pichia* foram dissolvidos em 5 M de ureia e foi usado 5 M de ureia contendo 400 mM de imidazol como tampão de eluição. O pico pôde ser observado entre as frações 3 e 4 coletadas (entre 50 e 60 min), conforme destacado no gráfico através de retângulos. O retângulo maior mostra o pico indicado dentro do retângulo menor, aumentado. Eixo x: tempo de eluição (min). Eixo y: absorbância a 280 nm (mAU). Linha azul não tracejada: 280 nm. Linha vermelha: 254 nm. Linha rosa: 215 nm.

#### 4.3.4 Avaliação das bandas de proteínas referentes aos potenciais alérgenos

Após a purificação, eletroforeses em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas para a avaliação das bandas proteicas referentes aos potenciais alérgenos. Para a devida avaliação, as sequências (dados não mostrados) e massas moleculares das proteínas recombinantes maduras (**Tabela 7**) foram acessadas com o programa Vector NTI e o website [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/). Os géis foram carregados com os picos (**Figura 22**) e as frações FT (**Figura 23**) referentes a 18 potenciais alérgenos e ao controle negativo anticorpo específico para o alérgeno de amêndoa. As frações FT e picos 1 e 2 da cupina de mandioca foram carregados em um gel a parte (**Figura 24**). Vale ressaltar que somente as frações FT e picos geradas com o sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL e tampão de eluição contendo 5 M de ureia e 400 mM de imidazol foram mostradas.

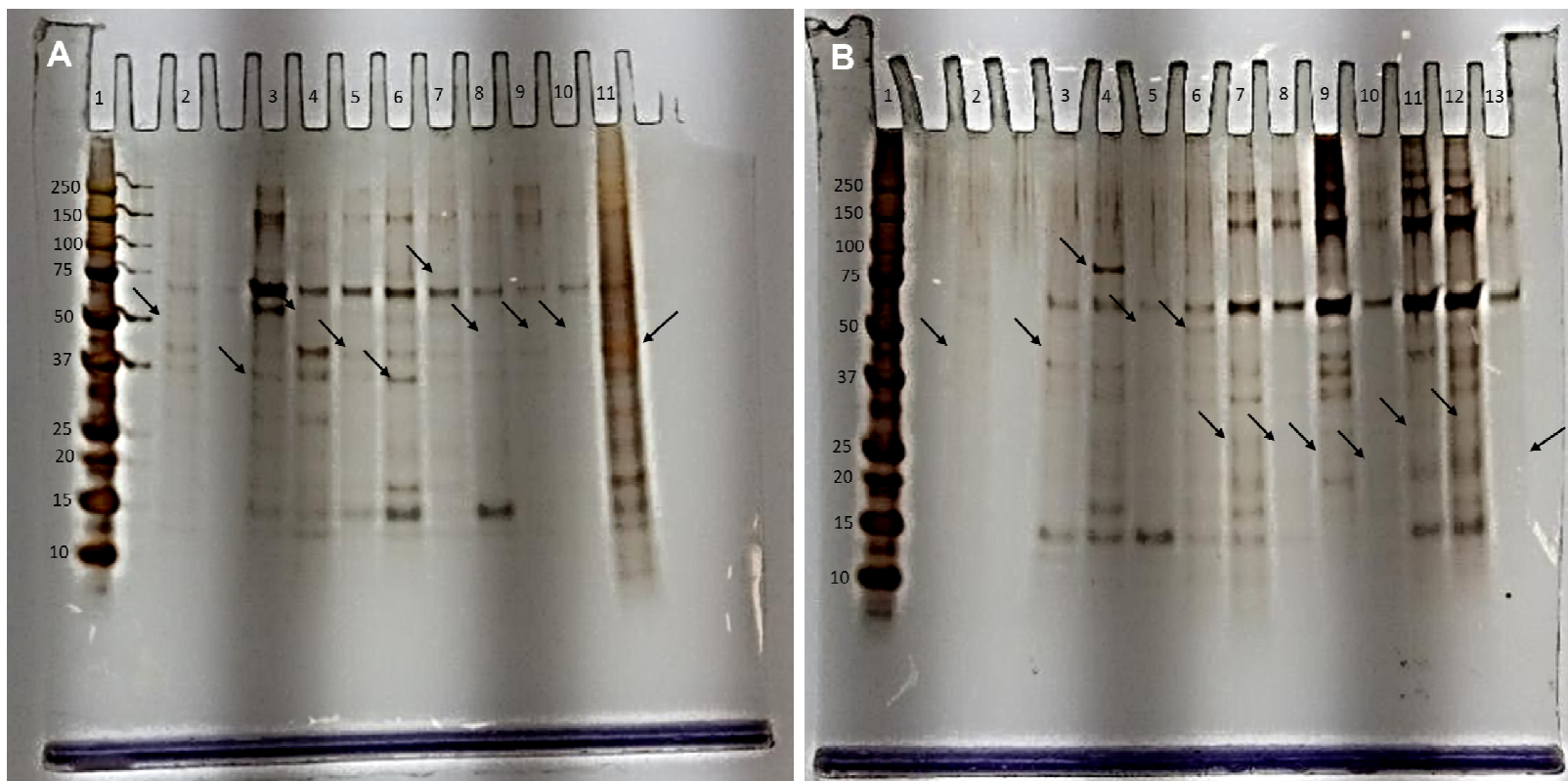
Como mostrado na **Figura 22**, alguns potenciais alérgenos estão evidentemente presentes, como a glicoxalase de mandioca contendo 35,94 kDa (gel A - posição 6) e homocisteína S-metiltransferase de manga com 88,01 kDa (gel B – posição 4). Por outro lado, devido à pequena quantidade das proteínas potencialmente alergênicas purificadas, outras bandas proteicas estão muito claras e parecem não estar presentes.

**Tabela 7.** Massas moleculares (MM) teóricas dos potenciais alérgenos em estudo (continua).

<i>Ananas comosus</i> (abacaxi)		<i>Mangifera indica</i> (manga)	
Proteína	MM (kDa)	Proteína	MM (kDa)
Enolase 1	51,32	Álcool desidrogenase	45,12
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2 (GAPDH C2)	36,42	3 cetoacil CoA tiolase B	48,59
Repetição rica em leucina (LRR)	54,27	Pequena GTP Rab GDI	53,09
Peroxidase	40,02	Homocisteína S-metiltransferase	88,01

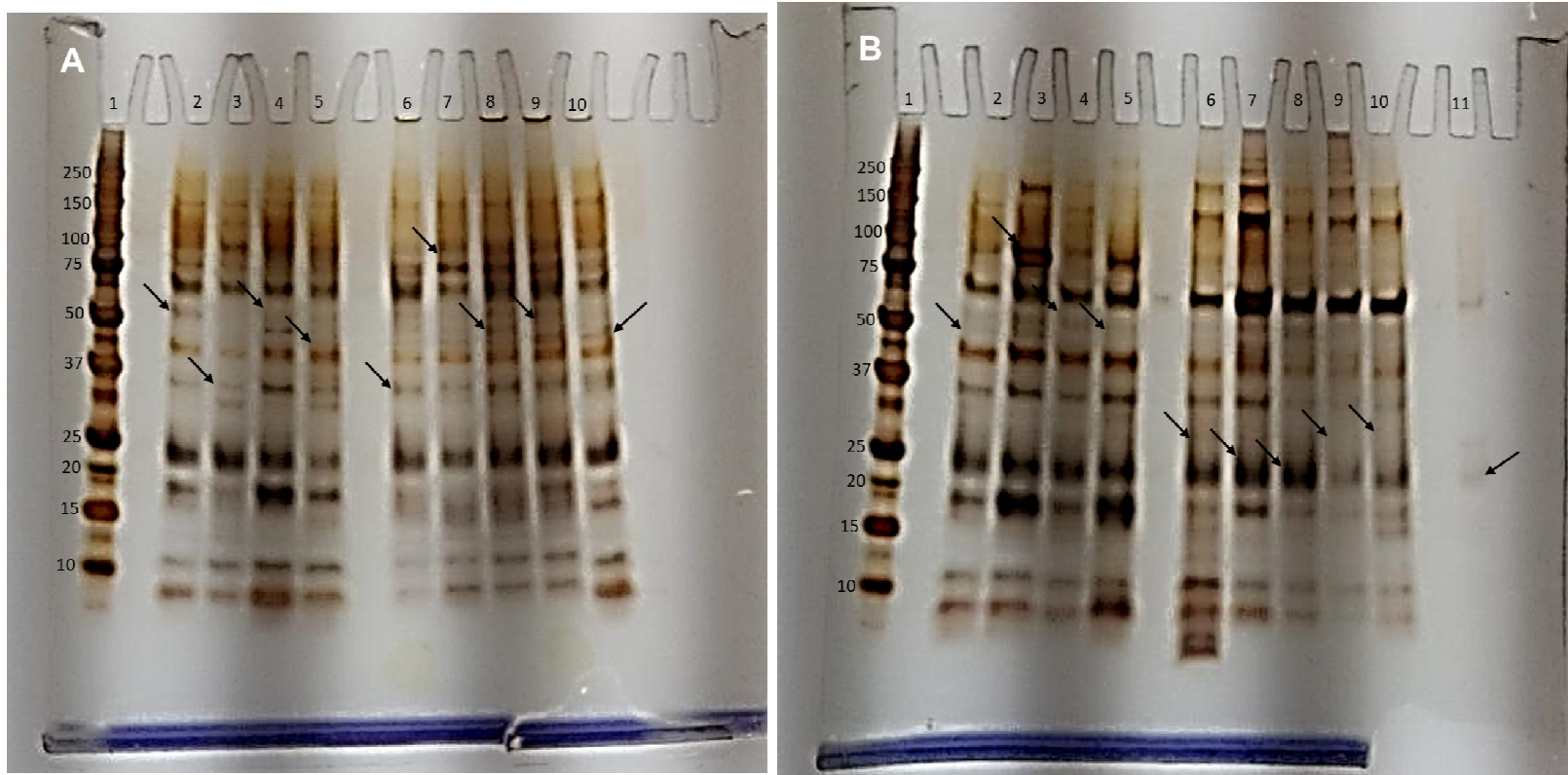
**Tabela 7.** Massas moleculares (MM) teóricas dos potenciais alérgenos em estudo (conclusão).

<b><i>Carica papaya</i></b>		<b><i>Manihot esculenta</i></b>	
<b>(mamão)</b>		<b>(mandioca)</b>	
<b>Proteína</b>	<b>MM (kDa)</b>	<b>Proteína</b>	<b>MM (kDa)</b>
Ascorbato peroxidase 2	30,92	Alfa/beta-Hidrolase	77,79
Germina-like	26,66	Glioxalase	35,94
Proteína relacionada à patógeno (PR)	28,85	Oxirredutase ligada ao NAD (P)	41,03
Peroxirredoxina 2F	25,14	RmIC-like cupina	41,28
Tiorredoxina	30,54	Inibidor de serina protease (SERPINA)	45,90
		Tiorredoxina	38,68



**Figure 22.** Géis SDS-PAGE carregados com as frações pico referentes à purificação dos potenciais alérgenos em sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL e tampão de eluição contendo 5 M de ureia e 400 mM de imidazol. As setas indicam as bandas proteicas referentes a cada potencial alérgeno purificado. **Gel A:** 1- Padrão de massa molecular *Precision plus protein* (Biorad, Hertfordshire, UK); 2 – Enolase 1 de abacaxi (51,32 kDa); 3 – GDPC2 de abacaxi (36,42 kDa); 4 – Repetição rica em leucina (LRR) de abacaxi (54,27 kDa); 5 – Peroxidase de abacaxi (40,02 kDa); 6 – Glioxalase de mandioca (35,94 kDa); 7- Alfa/beta Hidrolase de mandioca (77,79 kDa); 8- Oxirredutase de mandioca (41,03 kDa); 9- SERPINA de mandioca (Pico 1) (45,90 kDa); 10- SERPINA de mandioca (Pico 2) (45,90 kDa); 11- Tiorredoxina de mandioca (38,68 kDa). **Gel B:** 1- Padrão de massa molecular *Precision plus protein*; 2- Álcool desidrogenase de manga (Pico 1) (45,12 kDa); 3 – Álcool desidrogenase de manga (Pico 2) (45,12 kDa); 4- Homocisteína S-metiltransferase de manga (88,01 kDa); 5- Pequena GTP Rab GDI de manga (53,09 kDa); 6- 3 cetoacil CoA tiolase B de manga (48,59 kDa); 7- Ascorbato peroxidase de mamão (Pico 1) (30,92 kDa); 8- Ascorbato peroxidase de mamão (Pico 2) (30,92 kDa); 9- Germina-like de mamão (26,66 kDa); 10- Peroxirredoxina 2F de mamão (25,15 kDa); 11- PR de mamão (28,85 kDa); 12- Tiorredoxina de mamão (30,54 kDa); 13- Controle negativo anticorpo específico para o alérgeno de amêndoa (26 kDa).





**Figure 23.** Géis SDS-PAGE carregados com as frações *flow-through* (FT) (partes que não se ligam à coluna) referentes à purificação dos potenciais alérgenos em sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL e tampão de eluição contendo 5 M de ureia e 400 mM de imidazol. As setas indicam as bandas proteicas referentes a cada potencial alérgeno purificado. **Gel A:** 1- Padrão de massa molecular *Precision plus protein* (Biorad, Hertfordshire, UK); 2 – Enolase 1 de abacaxi (51,32 kDa); 3 – GDPC2 de abacaxi (36,42 kDa); 4 – Repetição rica em leucina (LRR) de abacaxi (54,27 kDa); 5 – Peroxidase de abacaxi (40,02 kDa); 6 – Glioxalase de mandioca (35,94 kDa); 7- Alfa/beta Hidrolase de mandioca (77,79 kDa); 8- Oxirredutase de mandioca (41,03 kDa); 9- SERPINA de mandioca (45,90 kDa); 10- Tiorredoxina de mandioca (38,68 kDa). **Gel B:** 1- Padrão de massa molecular *Precision plus protein*; 2- Álcool desidrogenase de manga (45,12 kDa); 3 - Homocisteína S-metiltransferase de manga (88,01 kDa); 4- Pequena GTP Rab GDI de manga (53,09 kDa); 5- 3 cetoacil CoA tiolase B de manga (48,59 kDa); 6- Ascorbato peroxidase de mamão (30,92 kDa); 7- Germina-like de mamão (26,66 kDa); 8- Peroxirredutase 2F de mamão (25,15 kDa); 9- PR de mamão (28,85 kDa); 10- Tiorredoxina de mamão (30,54 kDa); 11- Controle negativo anticorpo específico para o alérgeno de amêndoa (26 kDa).





**Figure 24.** Gel SDS-PAGE carregado com a fração *flow-through* (FT) (parte que não se ligou à coluna) e picos 1 e 2 referentes à purificação do potencial alérgico cupina de mandioca em sistema ÄKTA FPLC equipado com coluna HisTrap HP de 5 mL e tampão de eluição contendo 5 M de ureia e 400 mM de imidazol. As setas indicam as bandas proteicas referentes à cupina. 1- Padrão de massa molecular *Precision plus protein* (Biorad, Hertfordshire, UK); 2 – Cupina de mandioca (41,28 kDa) (FT); 3 – Cupina de mandioca (41,28 kDa) (Pico 1); 4 - Cupina de mandioca (41,28 kDa) (Pico 2).

#### 4.3.5 Determinação da concentração dos potenciais alérgicos

As concentrações de proteínas referentes às frações FT e aos potenciais alérgicos purificados (picos) foram determinadas como descrito no **item 3.2.3.10**. As concentrações mínimas de proteínas referentes ao FT e aos picos foram, respectivamente, 1000 µg/mL e 141,8 µg/mL (dados não mostrados). Desta maneira, foi possível determinar as concentrações finais de proteínas a serem impressas nos *microarrays*. Assim, após todas as frações serem liofilizadas, estas foram dissolvidas para as concentrações finais de 1000 µg/mL (FT) e 141,8 µg/mL (picos) em PBS e 10% de glicerol.

#### 4.4 Microarray

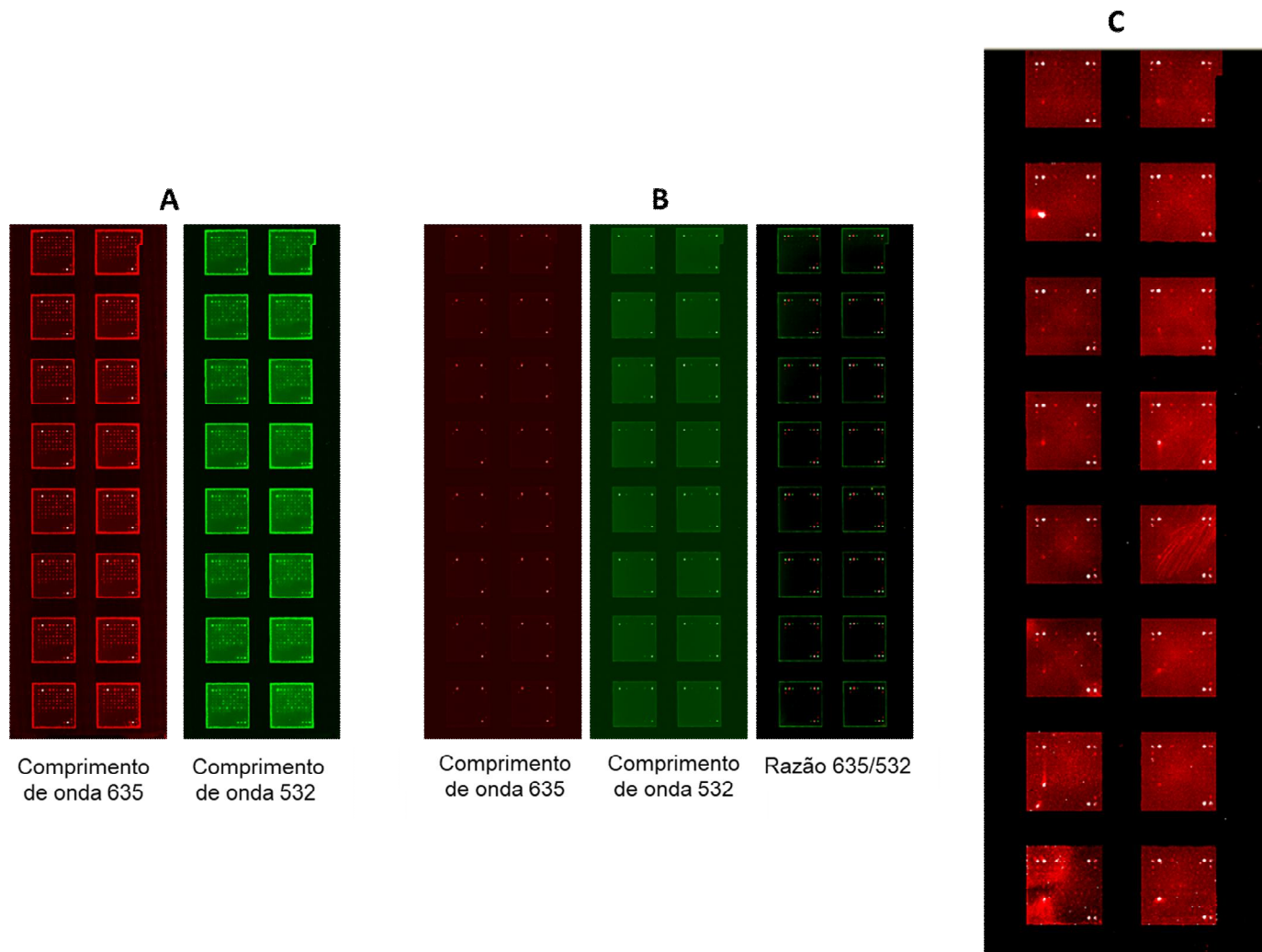
Os *microarrays* automatizados foram realizados em triplicata usando todas as 52 frações mostradas na **Figura 25**. O anticorpo específico para o alérgeno de amêndoa, PBS contendo 10% de glicerol, BSA 2% e leite em pó desnatado 2% também foram impressos nas lâminas e usados como controles negativos. Além disso, Cy3 e Cy5 diluídas a 1:100 e 1:10 foram utilizadas como marcadores. Em cada quadrante foram impressas alíquotas das 60 amostras, incluindo FT e picos das 19 proteínas de interesse, os dois marcadores (Cy3 e Cy5) em duas diferentes diluições e os controles negativos (**Figura 25**).

Vale observar que ambos, FT e picos, foram incluídos nos *arrays*, devido à purificação não ter sido completamente satisfatória. Desta maneira, as proteínas alergênicas de interesse poderiam também ainda estar presentes nas frações FT, além das frações pico.

Após as proteínas serem impressas nas lâminas através do *Microarrayer MicroGrid* (Digilab, Massachusetts, US) utilizando agulhas sólidas, estas foram incubadas com os soros dos 14 pacientes (**Tabela 1**) conforme indicado na **Figura 25**. O quadrante de número 4 referente ao Branco foi incubado com 2% de albumina de soro bovino (BSA) em vez de soro. Os Pacientes 13 e 14 (**Tabela 1**), o primeiro não-alérgico (NA) e o segundo não- alérgico aos alimentos em estudo (NAA), foram utilizados como controles (**Figura 25**). Por final, as três lâminas foram escaneadas no GenePix 4000B *microarray scanner* e as imagens foram analisadas com o programa GenePix. A **Figura 26** mostra um dos três *slides* confeccionados após as proteínas serem impressas, após o bloqueio e após a hibridização.

1	Paciente 13		2	Cy3 1:10	Cy5 1:10	Cy3 1:100	Abacaxi Enolase F.T.	Abacaxi Enolase Pico	Abacaxi GDPC2 F.T. (Sem ureia)	Abacaxi GDPC2 Pico1 (Sem ureia)	Cy3 1:100	Cy5 1:10	Cy3 1:100	
3	Paciente 14	Branco	4	Mandioca Cupina F.T.	Mandioca Cupina Pico	Mandioca Cupina F.T. F.R.	Mandioca Cupina Pico ACN20% F.R.	Mandioca Cupina Pico ACN 40% F.R.	Mandioca Cupina F.T. H.T. 1mL	Mandioca Cupina Pico H.T. 1mL	Mandioca Gioxalase F.T.	Mandioca Gioxalase Pico	Mandioca Gioxalase Pico	Mandioca Hidrolase F.T.
5	Paciente 1	Paciente 2	6	Mandioca Hidrolase Pico	Mandioca Oxirredutase F.T.	Mandioca Oxirredutase Pico	Mandioca Serpina F.T.	Mandioca Serpina Pico1	Mandioca Serpina Pico2	Mandioca Tiorredoxina F.T.	Mandioca Tiorredoxina Pico	Manga Aldeído desidrogenase F.T.	Manga Aldeído desidrogenase Pico1	Manga Aldeído desidrogenase Pico1
7	Paciente 3	Paciente 4	8	Mamão Germinálike F.T.	Mamão Germinálike Pico	Mamão Peroxirredoxina F.T.	Mamão Peroxirredoxina Pico	Mamão PR F.T.	Mamão PR Pico	Mamão Tiorredoxina F.T.	Mamão Tiorredoxina Pico	Mamão Ascorbato Peroxidase F.T.	Mamão Ascorbato Peroxidase Pico1	Mamão Ascorbato Peroxidase Pico2
9	Paciente 5	Paciente 6	10	BSA 2%	Leite 2%	Controle Negativo pMJA 181 Antes da purificação	PBS, glicerol 10%						Controle Negativo pMJA 181 F.T.	Controle Negativo pMJA 181 Pico
11	Paciente 7	Paciente 8	12											
13	Paciente 9	Paciente 10	14											Cy5 1:100
15	Paciente 11	Paciente 12	16								Cy 3 1:100	Cy5 1:10	Cy3 1:10	

**Figura 25.** Representação esquemática da lâmina de vidro (*slide*) (à esquerda) contendo 16 quadrantes com a indicação de qual soro de paciente foi utilizado em cada quadrante. Branco: quadrante onde não foi utilizado soro durante a hibridização. Paciente 13: Não-alérgico (NA). Paciente 14: Não-alérgico aos alimentos do estudo (NAA). Quadrado em cinza: não analisado. À direita está representado cada quadrante contendo as 60 frações impressas referentes aos potenciais alérgenos (sem cor), controles (amarelo) e marcadores (azul). Informações sobre os pacientes alérgicos estão mostradas na **Tabela 1**. F.T.: Fração *flow-through*; F.R.: Fase reversa.



**Figura 26.** *Microarray slide* (uma replicata) contendo 16 quadrantes depois das proteínas serem impressas (A), depois do bloqueio com BSA (B) e depois da hibridização (C) com os soros dos pacientes indicados na **Figura 25**. O *slide* foi escaneado à PMT600, utilizando-se o GenePix 4000B *microarray scanner*.

#### 4.4.1 Análise da reatividade dos potenciais alérgenos

Conforme já informado, os dados gerados pelo programa GenePix foram normalizados e a intensidade do sinal de fluorescência de cada amostra (*spot*) foi calculada pela subtração do sinal de fundo (*background*) local, e a média gerada através das três replicatas de *slides* foi utilizada para a confecção de gráficos.

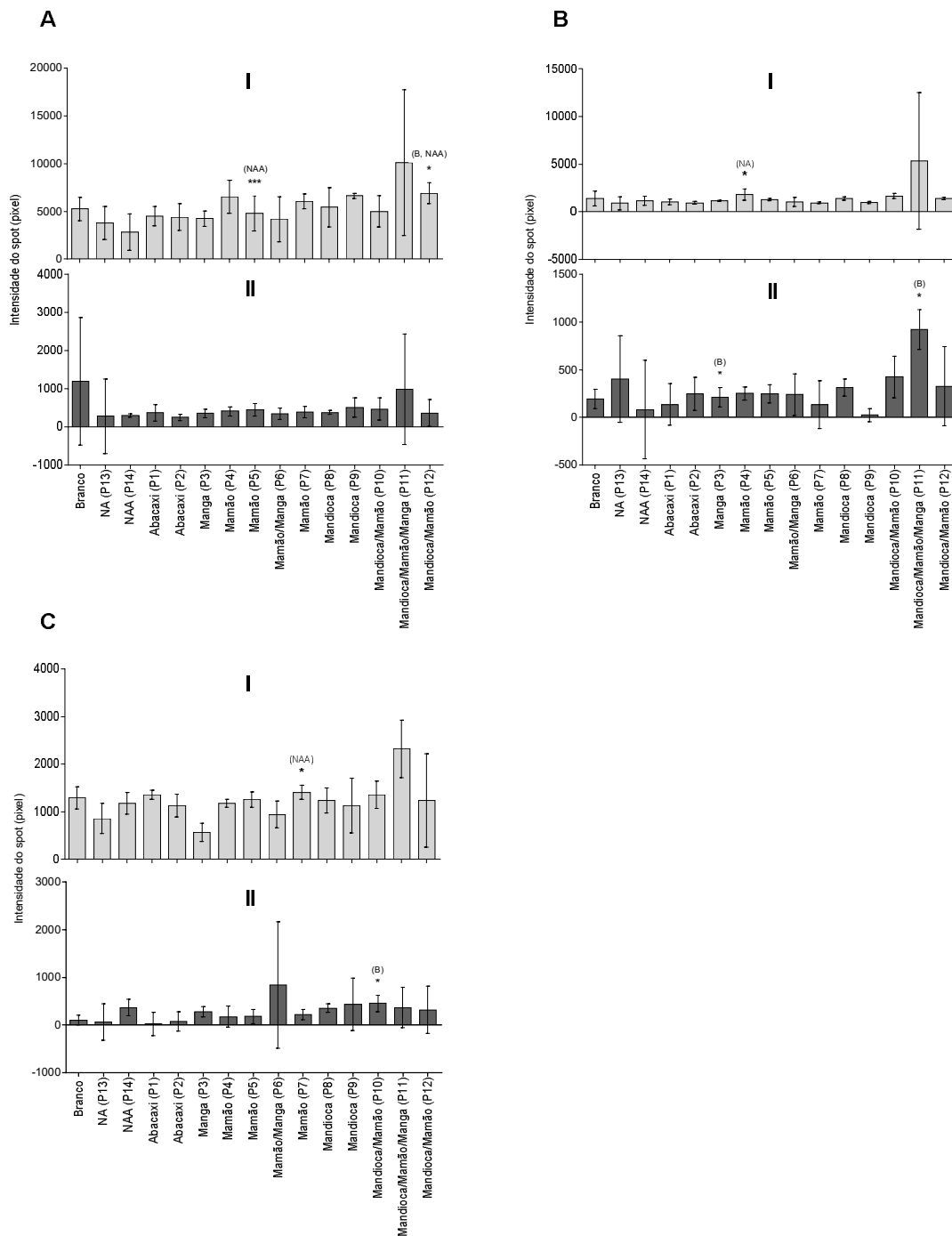
Os gráficos foram confeccionados através do programa *GraphPad Prism 7* e o Teste T pareado foi utilizado para a análise dos dados. Os valores referentes ao Branco (**Figura 25**), Paciente não-alérgico (NA) (Paciente 13 – **Tabela 1**) e Paciente não-alérgico aos alimentos estudados (Paciente 14 – **Tabela 1**) foram utilizados como controles. Assim, foi realizado o Teste T referente a cada um dos valores das intensidades dos *spots* correspondentes a cada uma das 52 frações, incluindo FT e picos, contra os valores referentes ao Branco, ao NA e ao NAA.

A seguir, foram discutidos os resultados de cada um dos 19 potenciais alérgenos.

##### 4.4.1.1 Abacaxi

###### 4.4.1.1.1 Enolase 1

Referente ao potencial alérgeno enolase 1 (**Figura 27A**), pode-se dizer que em relação ao branco (B), o valor para a intensidade do *spot* da fração *flow-through* (FT) (**Figura 27A-I**) foi significativo para o Paciente 12, alérgico à mandioca e mamão. Além disso, para a mesma fração, em relação ao paciente não alérgico aos alimentos em estudo (NAA), os valores para os Pacientes 12 e 5, este último alérgico a mamão, foram significativos. Nesse caso, podemos observar que a reatividade de anticorpos IgE encontrados nos pacientes alérgicos ao abacaxi (Pacientes 1 e 2) não foi significativa. Com relação à reatividade do paciente alérgico a mamão, é sabido que a proteína enolase pode ser encontrada nessa fruta (VALE et al., 2014) e também na mandioca (WANG et al., 2016), sendo, portanto, possível que ela seja um alérgeno também para o mamão e mandioca, mas que ainda não foi descrito para esses alimentos na plataforma de alérgenos *Allergome* (<http://www.allergome.org>).



**Figura 27.** Intensidades da reatividade dos spots (eixo y) referentes às frações FT (barras em cinza claro: A-I, B-I e C-I) e pico (barras em cinza escuro: A-II, B-II, C-II) adquiridos através da purificação dos potenciais alérgenos do abacaxi: enolase 1 (A), repetição rica em leucina (LRR) (B) e peroxidase (C), quando incubados com os soros dos quatorze pacientes utilizados nesse estudo (eixo x) (**Tabela 1**). Foram utilizadas a coluna His-Tag 5 mL e 5 M de ureia para a obtenção das frações. P: Paciente. Controles: NA - Paciente não alérgico (P13) e NAA - Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (P14). B\*, NA\* e NAA\*: Valores significativos para o Teste T pareado realizado em comparação aos

valores gerados através do Branco, Paciente Não alérgico e Paciente não alérgico aos alimentos em estudo, respectivamente.

Além disso, através da **Tabela 1**, podemos verificar que o Paciente 12, o qual apresentou valores significativos em relação ao branco e ao NAA, possui a síndrome látex-fruta em relação ao mamão e pêssago, sendo também alérgico ao látex. Quando a sequência referente à enolase 1 do abacaxi foi submetida ao BLAST, foi apontada a sequência referente à enolase 2 de *Hevea brasiliensis* (látex) com 92% de identidade em relação à do abacaxi. Uma vez que a enolase também ocorre no mamão (VALE et al., 2014), pode-se inferir que esta proteína seja uma das responsáveis pela reatividade cruzada entre mamão e látex para este paciente. Essa hipótese é reforçada pelo fato de a enolase já ter sido descrita como alérgeno do látex no *Allergome*, sendo denominada como Hev b 9.

Ainda através da BLAST, a sequência de *Prunus persica* (pêssego) também apresentou 92% de identidade em relação à enolase 1 do abacaxi. Uma vez que o Paciente 12 é alérgico ao pêssago, é possível que haja reatividade cruzada entre a enolase do látex e pêssago, caracterizando a síndrome látex-fruta desse paciente. Além disso, quando alinhamos no BLAST as sequências referentes à Hev b 9 e a enolase 1 que foi expressa neste trabalho, encontramos uma identidade de 89%, sustentando a hipótese de que a enolase pode ser um alérgeno ainda não descrito para o pêssago também.

O alinhamento realizado entre a Hev b 9 e a enolase 2 do látex contendo 92% de identidade em relação à do abacaxi mostrou cobertura de 99% e identidade de 90%. Assim, podemos concluir que estas duas sequências são muito parecidas, sendo que a enolase 2 para o látex parece ser uma isoforma da Hev b 9. Desta forma, podemos inferir que uma nova isoforma da Hev b 9 foi descoberta.

Por final, o alinhamento da enolase 1 do abacaxi (recombinante), enolase 2 do mamão (CP00005G00830) e enolase 1 da mandioca (Manes.01G023200.1) mostrou que essas proteínas possuem diversas partes conservadas (**Figura 28**). Este fato comprova a similaridade entre estas, e confirma, portanto, a IgE reatividade dos soros dos pacientes alérgicos ao mamão e do paciente alérgico à mandioca à enolase recombinante.

#### 4.4.1.1.2 Repetição rica em leucina (LRR)

As reações para as frações FT e pico para a LRR (**Figura 27B**), proteína selecionada para o abacaxi, não foram significativas para os pacientes alérgicos a esse alimento. Porém, para o Paciente 4, alérgico ao mamão, a reação da fração FT (**Figura 27B-I**) foi significativa em relação ao sinal obtido para o paciente não-alérgico (NA), assim como para os Pacientes 3, alérgico à manga, e 11, alérgico à mandioca, mamão e manga, a marcação para a fração pico (**Figura 27B-II**) foi significativa em relação ao branco (B).-

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

enolase                      -----EFM
CP00005G00830                -----M
Manes.01G023200.1            MALATQPASTATLLKKSFFSAKPSISISTSIFFPSVKPRSLVVRNIVSIVTSPSPAKIAKE

enolase                      VKITGVKARQIFDSRGNPTVEVDVCTDNGIFARAAVPSGASTGIYEALELRDGG-SDYLG
CP00005G00830                DTIVSVKARQIFDSRGNP-----
Manes.01G023200.1            CKVKSVKARQIIDS RGNPTVEVDL IADLLYR--SAPVSGASTGIYEALELRDGDKSVYVG
.: *.*****:*

enolase                      KGV LKAVNNTIIGPALIGKDPTQEIDNFVQQLDGTSN EWGCKQKLGANAILAVS
CP00005G00830                -----TVDPTEQVAIDNFVQQLDGTQNEWGCKQKLGANAILAVS
Manes.01G023200.1            KGV LNAVKNINDILGPKLIGVDVRNQQDDVDAIMLEIDGTPN-----KSKLGANAILGVS
.: * : * : * : : : * : : * : : : : : : : * : * : * : * : * : *

enolase                      LAVCKAGA AVKIPLYQHIANLAGNKKLTVLPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGA
CP00005G00830                LAVCKAGA AVKIPLYQHIANLAGNKKLTVLPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGA
Manes.01G023200.1            LSI CRAGAGVKVPL YKHIEISGT KELVMPVPAFNVINGGSHAGN LAMQEFMILPVGA
*: : * : * : * : * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

enolase                      SSFKEAMKMGVEVYHNLKAVIKKYGQDATIVGDEGGFAPNIQENKEGLELLKTAIAKAG
CP00005G00830                SSFREAMKMGVEVYHNLKAVIKKYGQDATIVGDEGGFAPNIQENKEGLELLKTAIAKAG
Manes.01G023200.1            TSFAEALRMGSEVYHTLKGIIKAKYGQDACIVGDEGGFAPNVQDMREGVLV LMDAIEKAG
*: : * : : * : * : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

enolase                      YTGKVIIGMDVAASEFYCEKQTYDLNFK EENNDGSQKISGD LKDLKSFVSEYPIVSI
CP00005G00830                YTEKVIIGMDVAASEFYGS-DKTYDLNFK EESNDGSQKISGEALKDLKSFVSEYPIVSI
Manes.01G023200.1            YTGKVIIGMDVAASEFLTK-DGRYDLNFKKQPNIDGAHVLSAQSLGELYKDFINDFPIVSI
*: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

enolase                      EDPFDQDDNHWYAKL TEEIGQQVQIVGD LLVTNPTRVAKAIS EKT CNALLKVNQIGSV
CP00005G00830                EDPFDQDDNHWYKLTSEIGEQQVQIVGD LLVTNPKRVEKAIN EKACNALLKVNQIGSV
Manes.01G023200.1            EDPFDQDDNHWYASLQSSV--DIQLVGD LLVTNPKRIAEAIQKACNGLL LKVNQIGTV
***** : * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

enolase                      TESIEAVKMSKRAGWIMASHRSGETEDTFIADLSVGLATGQIKTGAPCRSERLAKYNQL
CP00005G00830                TESIEAVKMSKQAGWVIMASHRSGETEDTFIADLSVGLATGQIKTGAPCRSERLAKYNQL
Manes.01G023200.1            TESIRAAALDSKAAGWVIMASHRSGETEDNF IADLSVGLASGQIKTGAPCRSERLAKYNQL
* * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

enolase                      LRIFEEELGDAAIYAGAKFRAPVEPYAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH
CP00005G00830                LRIFEEELGSEAVYGAQFRKPVPEY-----
Manes.01G023200.1            LRIFEEELG-IVRYAGEAFRSP-----
***** : * * * : * *

```

**Figura 28.** Alinhamento realizado entre as sequências proteicas da enolase 1 do abacaxi (recombinante), enolase 2 do mamão (acesso: CP00005G00830) e enolase 1 da mandioca (acesso: Manes.01G023200.1), através da ferramenta ClustalW ([www.genome.jp/tools-bin/clustalw](http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw)).

Quando a sequência referente à leucine RR selecionada neste trabalho foi submetida a análise pela BLAST, foi encontrada uma proteína do mamão com 60% de identidade. Isto pode explicar o fato dos Pacientes 4 e 11 serem IgE reativos em relação às frações *flow-through* (**Figura 27B-I**) e pico (**Figura 27B-II**), respectivamente, sugerindo que talvez LRR seja um alérgeno que ainda não foi descrito para esse fruto.



Ainda, é sabido que a proteína LRR pode ser encontrada na manga (TAFOLLA-ARELLANO et al., 2017), comprovando a IgE reatividade do soro do Paciente 3, alérgico somente à manga, e do Paciente 11, alérgico também à manga.

Além disso, pode ser observado na **Tabela 1**, que o Paciente 4 é alérgico também à cenoura, e o Paciente 11 tem alergia ao pêssego, maçã, banana e látex. Quando a LRR recombinante foi submetida à BLAST, foram encontradas proteínas similares para o pêssego, maçã, banana e látex, contendo respectivamente: 55%, 55%, 63% e 55% de identidade. Porém, não foi encontrada proteína similar na cenoura, confirmando a IgE reatividade do P4 à LRR do mamão. Ainda, podemos inferir que a proteína LRR pode ser responsável pela reatividade cruzada entre mamão, manga, pêssego, maçã, banana e látex no Paciente 11.

Assim, podemos concluir que pelo fato da LRR ainda não ter sido descrita para o pêssego, maçã, banana e látex, ela pode ser considerada um novo potencial alérgeno para esses também.

#### **4.4.1.1.3 Peroxidase**

Em relação à peroxidase (**Figura 27C**), o Paciente 7, alérgico somente ao mamão, e Paciente 10, alérgico à mandioca e mamão, mostraram diferença estatística significativa dos sinais da marcação quando comparados aos do paciente NAA e ao branco, respectivamente. De fato, a sequência de aminoácidos referente à peroxidase produzida neste trabalho apresentou 65% de identidade em relação à proteína peroxidase 3-like que ocorre na mandioca e no látex. Uma vez que o Paciente 10 é alérgico à mandioca e ao látex, podemos concluir que essa peroxidase é um provável alérgeno de reatividade cruzada, mas que ainda não foi descrito para ambos.

Além disso, é sabido que a proteína peroxidase pode ser encontrada no mamão (PANDEY et al., 2012), comprovando a IgE reatividade do soro do Paciente 7, alérgico somente ao mamão, à peroxidase recombinante. O fato do Paciente 10 também ser alérgico ao mamão pode confirmar a peroxidase como um provável novo alérgeno desse alimento, uma vez que ela ainda não foi descrita para esse fruto.

Como observado na **Tabela 1**, o Paciente 10 possui dermatografia ao kiwi, mamão, abacate e banana. Através da BLAST, foram encontradas sequências para o kiwi e banana similares à peroxidase recombinante, contendo respectivamente, 66% e 67% de identidade. Esse fato poderia corroborar a dermatografia ao kiwi e à banana do P10. Uma vez que a peroxidase ainda não foi descrita como alérgeno para a banana e kiwi, podem ser novos potenciais alérgenos para estes alimentos.

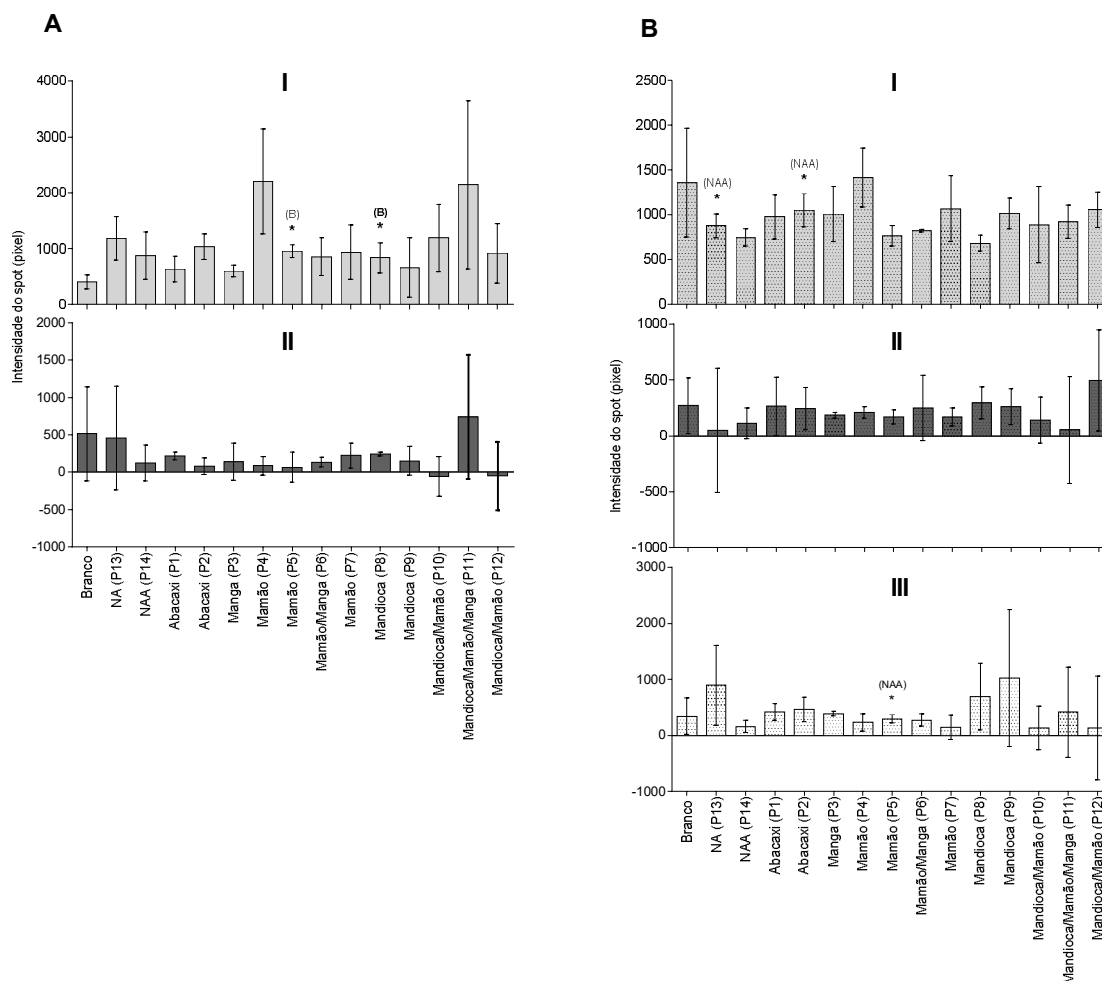
#### 4.4.1.1.4 Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase C2 (GDPC2)

A diferença entre o sinal da marcação relativa à proteína recombinante GDPC2 (**Figura 29**), e o do branco, para os Pacientes 5, alérgico ao mamão, e Paciente 8, alérgico à mandioca, foi estatisticamente significativa referente à fração FT (**Figura 29A-I**). Além disso, a diferença também foi significativa para a fração FT (Sem ureia) (**Figura 29B-I**) em relação ao paciente NAA e ao Paciente 2, alérgico ao abacaxi. Da mesma forma, também o sinal relativo à fração pico 2 (Sem ureia) (**Figura 29B-III**) para o Paciente 5, alérgico ao mamão, foi significativamente maior quando comparado ao NAA.

Com relação à fração FT (Sem ureia) (**Figura 29B-I**) da proteína GDPC2 recombinante houve reatividade de IgE no soro do Paciente 2, alérgico ao abacaxi. Desta forma, é bastante provável que a GDPC2 seja um novo alérgeno para este alimento, uma vez que ainda não foi descrito no *Allergome*.

Além disso, quando a sua sequência foi submetida a análise pela ferramenta BLAST, foi encontrado 76% de identidade em relação à GAPDH da mandioca. Conforme já citado, a reação do soro do Paciente 8, alérgico somente à mandioca, foi estatisticamente significativa em relação ao branco para a fração *flow-through* (**Figura 29A-I**), o que pode ser explicado pelo fato de que a GAPDH já foi descrita no *Allergome* como um alérgeno para a mandioca, denominado Man e GAPDH.

Ainda, conforme já comentado, uma vez que os valores para a intensidade dos *spots* foram significativos para o Paciente 5 em relação à fração FT (**Figura 29A-I**) e pico 2 (**Figura 29B-III**), e este paciente é alérgico somente ao mamão, e sabendo-se que a GAPDH faz parte da composição desse alimento, podemos dizer que provavelmente essa proteína seja também um novo alérgeno para o mamão.

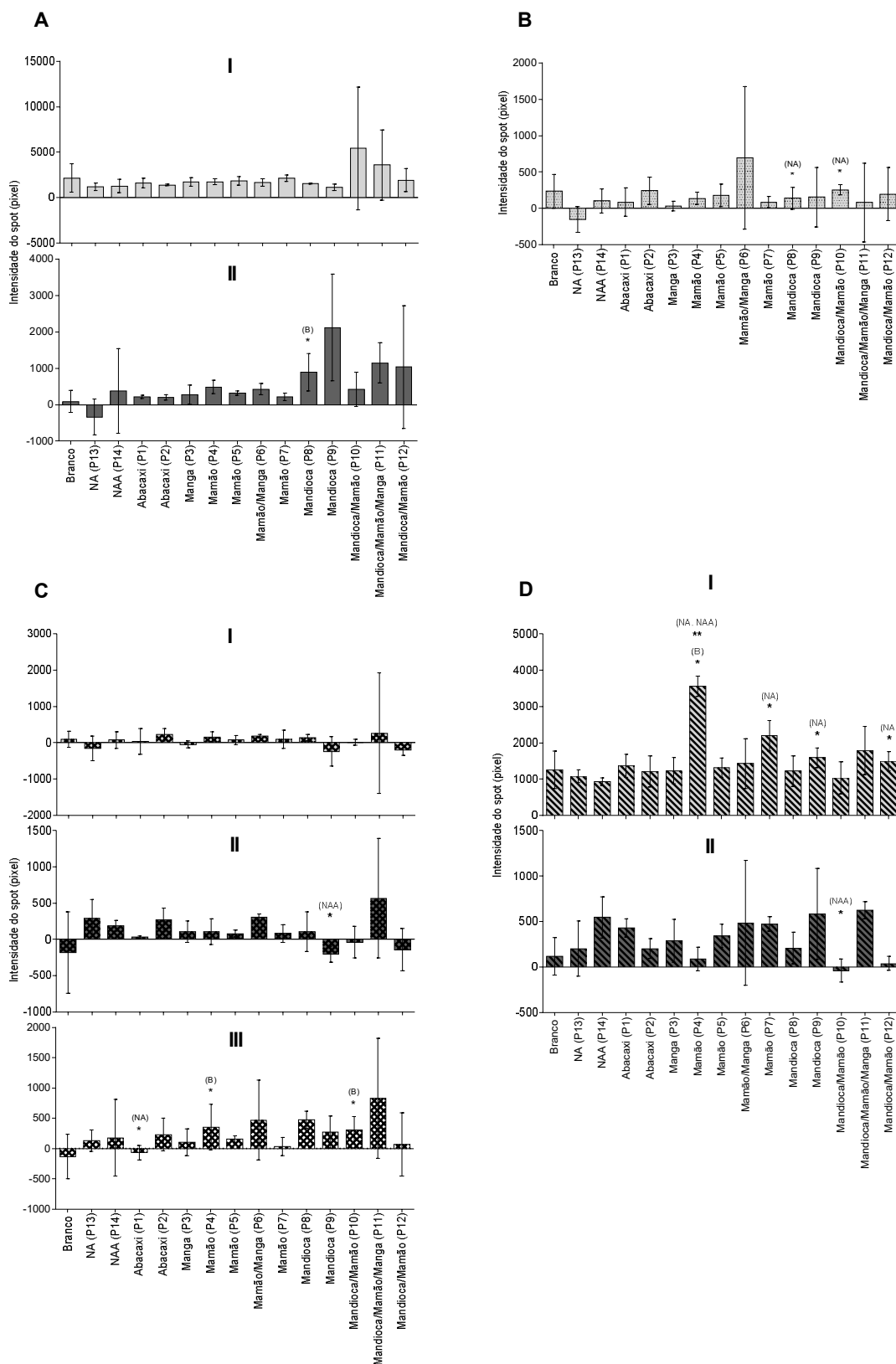


**Figura 29.** Intensidades da reatividade dos *spots* (eixo y) referentes às frações FT (barras em cinza claro: A-I, B-I), pico 1 (barras em cinza escuro: A-I, B-II) e pico 2 (barras brancas pontilhadas: B-III) adquiridos através da purificação da GDPC2, potencial alérgeno do abacaxi, quando incubados com os soros dos quatorze pacientes utilizados nesse estudo (eixo x) (**Tabela 1**). Foi utilizada a coluna His-Tag 5 mL utilizando-se 5 M de ureia (A) e também sem ureia (B) para a obtenção das frações. P: Paciente. Controles: NA - Paciente não alérgico (P13) e NAA - Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (P14). B\*, NA\* e NAA\*: Valores significativos para o Teste T pareado realizado em comparação aos valores gerados através do Branco (B), Paciente Não alérgico (NA) e Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (NAA), respectivamente.

#### 4.4.1.2 Mandioca

##### 4.4.1.2.1 RmIC-like cupina

O potencial alérgeno cupina, selecionado para a mandioca, mostrou valores de reatividade estatisticamente significativos para os pacientes alérgicos somente à mandioca, somente ao mamão, ou alérgicos a ambos os alimentos (**Figura 30**). A fração pico (**Figura 30A-II**) mostrou-se significativa em relação ao branco para o Pa-



**Figura 30.** Intensidades da reatividade dos spots (eixo y) referentes às frações FT (barras em cinza claro: A-I, B, C-I, D-I), pico 1 (barras em cinza escuro: A-II, C-II e D-II) e pico 2 (barras brancas

pontilhadas: C-III) adquiridos através da purificação da cupina, potencial alérgeno da mandioca, quando incubados com os soros dos quatorze pacientes utilizados nesse estudo (eixo x) (**Tabela 1**). A e D: Coluna His-Tag 5 mL e 1 mL, respectivamente, utilizando-se ureia. B: Coluna His-Tag 5 mL sem ureia, na qual não se obtiveram picos. C: Coluna de fase-reversa (C-II: Pico utilizando-se ACN 20%; C-III: Pico ACN 40%). P: Paciente. Controles: NA: Paciente não alérgico (Paciente 13) e NAA: Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (Paciente 14). B\*, NA\* e NAA\*: Valores significativos para o Teste T pareado realizado em comparação aos valores gerados através do Branco (B), Paciente Não alérgico (NA) e Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (NAA), respectivamente.

ciente 8, alérgico à mandioca, e a fração *flow-through* (sem ureia e sem picos) (**Figura 30B**) mostrou-se significativa quando comparada ao paciente não alérgico (NA) também para o Paciente 8 e para o Paciente 10, alérgico à mandioca e mamão. Além disso, para a fração pico (ACN 40%) – Fase reversa (**Figura 30C-III**), o Paciente 4, alérgico ao mamão, e o Paciente 10, alérgico a mandioca e mamão, mostraram valores significativos em relação ao branco. Já para a fração FT – HT 1 mL (**Figura 30D-I**) foi observado que os Pacientes 4 e 7, alérgicos ao mamão, e Pacientes 9 e 12, alérgicos, respectivamente, à mandioca e mandioca e mamão, foram significativos quando comparados ao paciente não alérgico (NA). No caso do Paciente 4, vale destacar que os valores foram significativos também em relação ao branco e ao paciente não alérgico aos alimentos em estudo (NAA).

Com base nesses resultados, é bastante provável que a cupina presente na mandioca seja um novo alérgeno, ainda não reportado na literatura, já que pacientes alérgicos a esse alimento apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparados aos controles e ao branco.

Além disso, foi observado que pacientes alérgicos ao mamão também foram IgE reativos às frações testadas referentes à cupina da mandioca. É oportuno comentar que, quando a sequência da cupina foi submetida a análise com a ferramenta BLAST, houve 79% de identidade em relação à legumina A do mamão (*Carica papaya*), assim como houve 90% da identidade em relação à glutelina tipo-A-1-like (cupina) para o látex (*Hevea brasiliensis*). A esse respeito merece destaque o fato de os Pacientes 10 e 12 serem alérgicos também ao látex, o que é sugestivo de que há reatividade cruzada entre a cupina da mandioca, a legumina A do mamão, que também pertence à família das cupinas, e a glutelina do látex. Como a legumina A e a glutelina ainda não foram descritas como alérgenos para o mamão e látex, respectivamente, esses resultados são muito promissores.

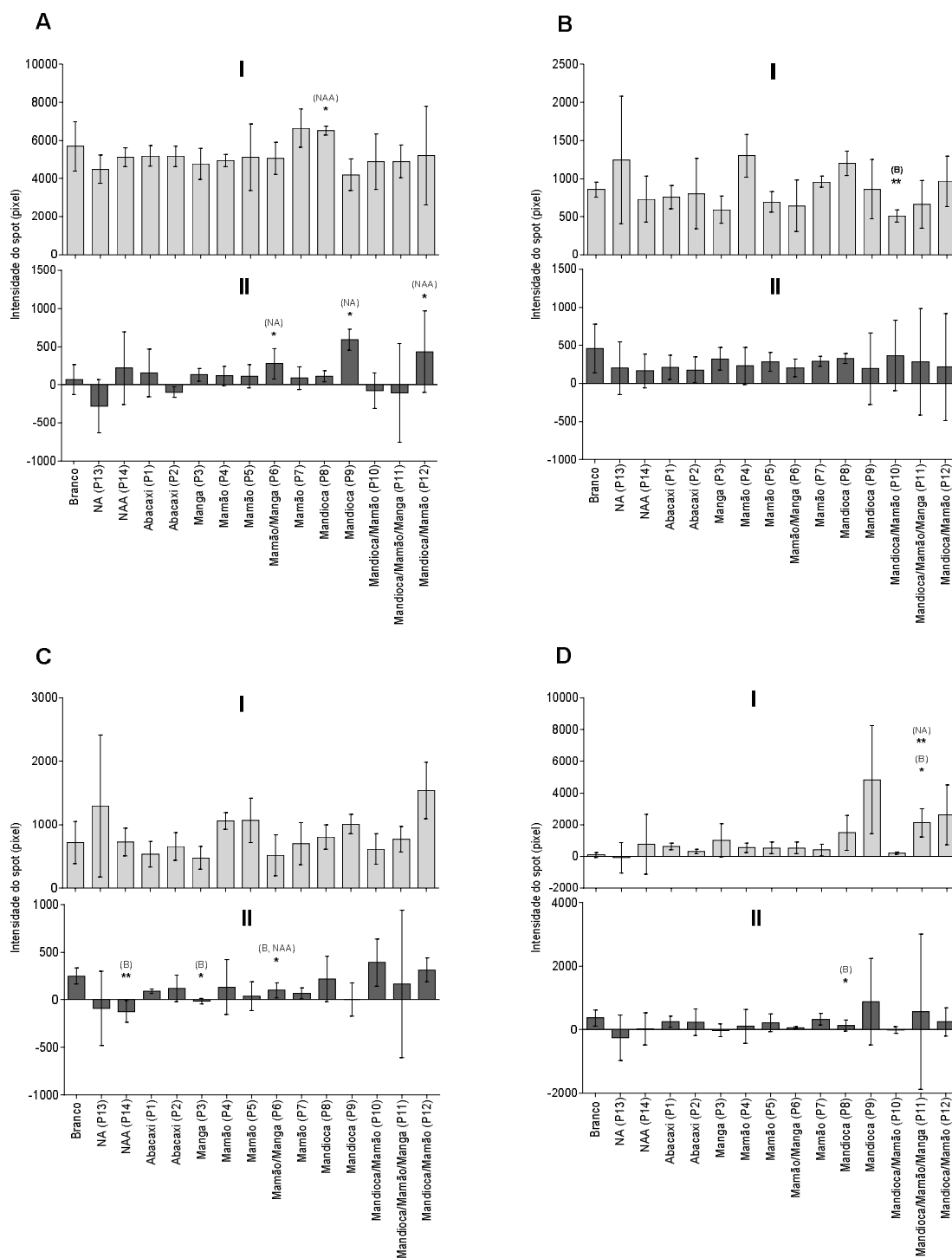
#### 4.4.1.2.2 Tiorredoxina

Com relação à tiorredoxina, potencial alérgeno da mandioca, observamos na **Figura 31A**, que o Paciente 8, alérgico à essa raiz tuberosa, possuiu diferença significativa em relação ao NAA para a fração FT (**Figura 31A-I**). Além disso, podemos observar que os Pacientes 6, alérgico ao mamão e manga, e 9, alérgico à mandioca, foram estatisticamente significativos em relação à fração pico (**Figura 31A-II**) quando comparados ao Paciente NA. Ainda em relação à fração pico, o Paciente 12, alérgico à mandioca e mamão, teve o valor de intensidade do *spot* significativo em relação ao Paciente NAA.

É interessante comentar que os Pacientes 8, 9 e 12, alérgicos à mandioca, tiveram os valores da intensidade do *spot* para a tiorredoxina, potencial alérgeno para esse alimento, significativos quando comparados ao NA (Paciente 8) e ao NAA (Pacientes 9 e 12). Dessa forma, podemos concluir que muito provavelmente a tiorredoxina é um novo alérgeno para a mandioca, sendo que este ainda não foi descrito para esse alimento no *Allergome*. Essa conclusão pode ser sustentada pelo fato do Paciente 8 ser alérgico somente à mandioca (**Tabela 1**).

Ainda, quando submetemos a sequência da tiorredoxina recombinante excretada pela *Pichia* a análise pela ferramenta BLAST, encontramos as proteínas disulfide-isomerase A6 isoform X1, disulfide-isomerase A6 e disulfide-isomerase A6 like 2-1-like para o látex, contendo, respectivamente, 77%, 75% e 82% de identidade em relação àquela encontrada na mandioca. Dessa forma, podemos inferir que há reatividade cruzada entre a tiorredoxina da mandioca e a disulfide-isomerase A6 do látex, a qual é também uma tiorredoxina. Esta informação pode ser sustentada através do fato dos Pacientes 9, 6 e 12 serem alérgicos também ao látex.

Foi observado no *Allergome* que já há uma tiorredoxina descrita como alérgeno do látex, denominada Hev b Trx. Ainda quando se utiliza a ferramenta BLAST, sendo a Hev b Trx alinhada à disulfide-isomerase A6 do látex, encontra-se apenas 29% de identidade. Vale observar que a sequência da Hev b Trx encontrada no *Allergome* é bastante pequena, sendo uma oxidoredutase. Desta maneira, há a probabilidade de uma outra tiorredoxina, a disulfide-isomerase A6, ser também alérgeno do látex.



**Figura 31.** Intensidades da reatividade dos spots (eixo y) referentes às frações FT (barras em cinza claro: A-I, B-I, C-I, D-I) e pico (barras em cinza escuro: A-II, B-II, C-II e D-II) adquiridos através da purificação dos potenciais alérgenos da mandioca: tiorredoxina (A), glioxalase (B), alfa/beta hidrolase (C) e oxidorredutase (D), quando incubados com os soros dos quatorze pacientes utilizados nesse estudo (eixo x) (Tabela 1). Foram utilizadas a coluna His-Tag 5 mL e 5M de ureia para a obtenção das frações. B: Branco. Controles: NA: Paciente não alérgico (Paciente 13) e NAA: Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (Paciente 14). B\*, NA\* e NAA\*: Valores significativos para o Teste T

pareado realizado em comparação aos valores gerados através do Branco, Paciente Não alérgico e Paciente não alérgico aos alimentos em estudo, respectivamente.

Algumas outras relações referentes à tiorredoxina recombinante produzida neste trabalho também podem ser feitas. Observa-se na **Tabela 1**, que os Pacientes 6 e 12 são alérgicos também ao mamão. Através da BLAST, foi encontrada a sequência referente à proteína disulfide-isomerase A6 para o *Carica papaya* (mamão) contendo 72% de identidade em relação à tiorredoxina para a mandioca recombinante. Dessa forma, talvez haja reatividade cruzada entre estas duas proteínas.

Ainda através da BLAST, foram encontradas as proteínas disulfide-isomerase para o pêssego (*Prunus persica*), maçã (*Malus domestica*) e batata (*Solanum tuberosum*), contendo, respectivamente, 83%, 82% e 76% de identidade em relação à tiorredoxina recombinante de mandioca. Isso pode explicar o fato do Paciente 6 ser também alérgico à maçã e pêssego, e o Paciente 12, alérgico também ao pêssego e batata.

#### 4.4.1.2.3 Glioxalase

Para as frações referentes ao potencial alérgico glioxalase (**Figura 31B**), o qual foi selecionado neste trabalho para a mandioca, não foi observada diferença significativa positiva dentre os Pacientes, quando comparados ao branco, NA ou NAA. Portanto, a glioxalase mostrou-se não ser um potencial alérgico para os alimentos em estudo.

#### 4.4.1.2.4 Alfa/beta Hidrolase

Em relação às frações FT e pico referentes à hidrolase (**Figuras 31C-I e 31C-II**, respectivamente), potencial alérgico para a mandioca, podemos observar que o Paciente 6, alérgico ao mamão e manga, apresentou diferença significativa positiva em comparação ao NAA para a fração pico. Porém, a hidrolase recombinante não apresentou nenhum paciente alérgico à mandioca significativo.

Quando a sequência da hidrolase recombinante foi submetida à BLAST, foram observadas proteínas similares para o látex, maçã, e pêssego, contendo 93%,



78% e 78% de identidade, respectivamente. Porém, não foram observadas proteínas similares para o mamão e manga. Sabendo-se que o Paciente 6 também é alérgico ao látex, maçã e pêssego (**Tabela 1**), e, portanto, pode-se inferir que há reatividade cruzada entre a hidrolase recombinante, entre esses dois alimentos e o látex, caracterizando a síndrome látex-fruta do paciente. Como ainda não há nenhuma hidrolase descrita como alérgeno para a maçã e pêssego no *Allergome*, estas podem, provavelmente, serem novos alérgenos para estes frutos.

Além disso, pode-se observar através do *Allergome*, que uma hidrolase (esterase) já foi descrita como alérgeno do látex, sendo denominada Hev b 13. Quando essa foi alinhada à proteína para o látex semelhante à hidrolase expressa neste trabalho encontrada através da BLAST, denominada proteína não caracterizada LOC110640795, foi encontrada somente 40% de identidade. Portanto, provavelmente, esse seja um novo alérgeno para o látex. Ainda, no *Allergome* já foram descritas hidrolases (chitinases) para a manga e mamão, como, por exemplo, Man i chitinase e Car p chitinase, respectivamente, reforçando a probabilidade da hidrolase recombinante expressa nesse trabalho ser um novo alérgeno.

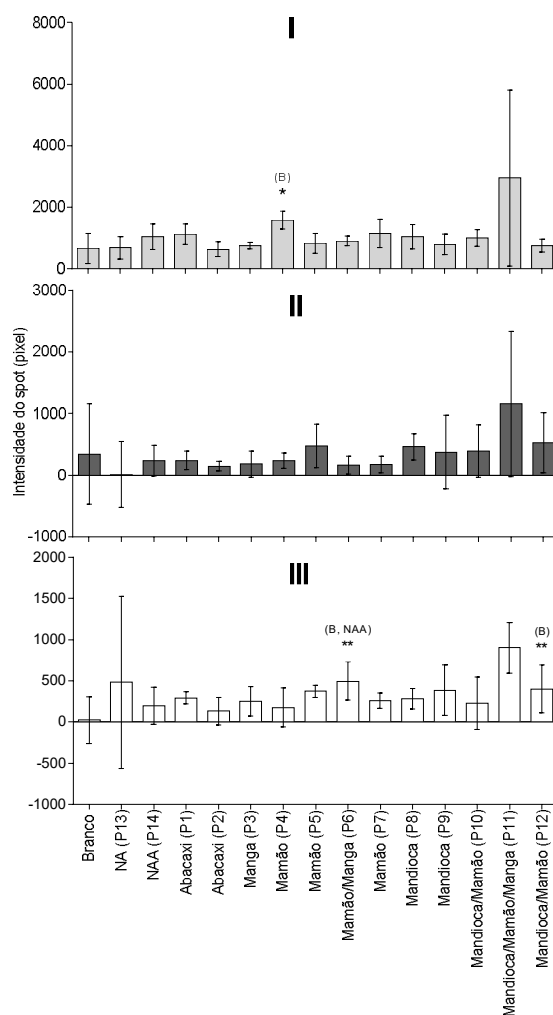
#### 4.4.1.2.5 Oxidorredutase ligada ao NAD (P)

Podemos observar na **Figura 31D-I** que o Paciente 11, alérgico à mandioca, mamão e manga, apresentou valor significativo para a fração FT referente ao potencial alérgeno oxidorrredutase para a mandioca, quando comparado ao branco e ao NA.

Através da **Tabela 1**, podemos observar que o Paciente 11 também é alérgico ao pêssego, maçã e banana, porém quando a sequência referente à proteína madura expressa nesse trabalho foi submetida à ferramenta BLAST, foi possível observar sequência similar para o mamão apenas (provável aldo-keto reductase 2), contendo 83% de identidade em relação à recombinante. Desta forma, podemos concluir que provavelmente haja reatividade cruzada entre a proteína recombinante e a proteína do mamão, tornando-se um provável alérgeno para esses alimentos, uma vez que esses ainda não foram descritos no *Allergome*.

#### 4.4.1.2.6 Inibidor de serina protease

Com relação ao potencial alérgeno da mandioca, inibidor de serina protease (SERPINA), podemos observar na **Figura 32**, que para a fração FT (I), o Paciente P4 possui diferença significativa quando comparado ao branco. Ainda na **Figura 32**, podemos verificar que os Pacientes 6 e 12 foram estatisticamente significativos em relação em relação à fração pico 2 (III), quando comparados ao branco e NAA, e



**Figura 32.** Intensidades da reatividade dos spots (eixo y) referentes às frações FT (barras em cinza claro: I), pico 1 (barras em cinza escuro: II) e pico 2 (barras em branco: III) adquiridos através da purificação da SERPINA, potencial alérgeno da mandioca, quando incubados com os soros dos quatorze pacientes utilizados nesse estudo (eixo x) (**Tabela 1**). Foram utilizadas a coluna His-Tag 5 mL e 5 M de ureia para a obtenção das frações. B: Branco. Controles: NA: Paciente não alérgico (Paciente 13) e NAA: Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (Paciente 14). B\*, NA\* e NAA\*: Valores significativos para o Teste T pareado realizado em comparação aos valores gerados através do Branco, Paciente Não alérgico e Paciente não alérgico aos alimentos em estudo, respectivamente.

branco, respectivamente. Dentre os pacientes significativos citados acima, o único alérgico à mandioca é o 12, sendo esse paciente alérgico também ao mamão, látex, pêssego, batata e avelã. Quando a sequência referente à SERPINA recombinante foi submetida à BLAST, foram encontradas sequências similares (serpina-ZX) para o látex, pêssego e batata, contendo respectivamente, 89%, 77% e 74% de identidade em relação à proteína recombinante. Desta forma, podemos inferir que há reatividade cruzada entre as proteínas desses alimentos, incluindo a mandioca, e o látex, ou seja, pode ser que essas proteínas partilhem os mesmos epítomos.

Foi verificado no *Allergome* que já foram descritas três SERPINAS para o látex, Hev b SPI, Hev b 15 e Hev b 15.0101 (isoforma), e duas para a batata, Sola t 4 e Sola t 4.0101 (isoforma). Quando estas foram comparadas às SERPINAS para estes mesmos alimentos observadas através da BLAST, encontramos 50% de identidade para a SERPINA do látex e 56% de identidade em relação à SERPINA da batata, porém, apenas 2% de cobertura comum para ambas. Esse fato pode confirmar a reatividade de IgE do soro desse paciente com a SERPINA recombinante expressa nesse trabalho.

Através da **Tabela 1**, pode-se verificar que o Paciente 6 também é alérgico à maçã, látex, abacate e pêssego, além de ao mamão e manga. Dentre estes observaram-se proteínas similares à SERPINA recombinante apenas para a maçã (identidade de 77%), látex e pêssego, estes últimos já citados para o Paciente 12. Dessa forma, podemos inferir que o resultado relativo ao Paciente 6 é uma confirmação para a reação ocorrida para o Paciente 12 quanto à reatividade de IgE às proteínas do látex e pêssego. Assim, podemos concluir que pode haver reatividade cruzada entre as SERPINAS do látex e pêssego e dessas duas em relação à SERPINA da maçã. Foi verificado no banco de dados de alérgenos *Allergome* que ainda não foram descritas como alérgenos SERPINAS para o pêssego e maçã.

Em relação ao Paciente 4, alérgico ao mamão e cenoura, foi observada uma proteína semelhante à SERPINA recombinante através da BLAST para a cenoura, contendo 73% de identidade, mas não para o mamão. Dessa forma, podemos dizer que a reatividade de IgE para esse paciente é devido à SERPINA da cenoura, a qual ainda não foi descrita como alérgeno no *Allergome*.

Podemos observar que os 3 Pacientes significativos em relação às frações referentes à SERPINA recombinante são alérgicos ao mamão. Sabendo-se que há a proteína SERPINA-like no mamão (SILAS et al., 2012), podemos inferir que esta pode ser um novo alérgeno para esse fruto, uma vez que não há SERPINAS descritas como alérgenos para esse alimento no banco de dados de alérgenos.

#### 4.4.1.3 Manga

##### 4.4.1.3.1 Álcool desidrogenase

Em relação à álcool desidrogenase, potencial alérgeno para a manga, podemos observar na **Figura 33A**, relativo à fração FT (**Figura 33A-I**), que o Paciente 9, alérgico à mandioca e ao látex, apresentou diferença significativa quando comparado ao NAA. Além disso, em relação à fração pico 1 (**Figura 33A-II**), os Pacientes 3, alérgico somente à manga, e Paciente 6, alérgico ao mamão e manga, foram significativos quando comparados aos pacientes NAA e NA, respectivamente. Por final, para a fração pico 2, (**Figura 33A-III**) o Paciente 10, alérgico à mandioca e mamão, apresentou diferença significativa quando comparado ao Paciente NA.

Conforme citado, o Paciente 9 é alérgico à mandioca e látex, e para a sequência referente à álcool desidrogenase recombinante foi encontrada uma sequência similar para o látex com 90% de identidade em relação à recombinante. Além disso, a proteína álcool desidrogenase já foi identificada na mandioca (SCHMITZ et al., 2016) e, assim, é possível inferir que ela se constitua em um novo alérgeno para a mandioca e o látex.

Podemos concluir também, através da **Figura 33A-II**, que a álcool desidrogenase expressa nesse trabalho como potencial alérgeno da manga pode ser uma proteína alergênica desse alimento, uma vez que o Paciente 3, alérgico a esse fruto, apresentou reatividade significativa quando comparado ao paciente NAA.

Além disso, podemos confirmar a reatividade de IgE à álcool desidrogenase da manga, pelo fato dessa ter reagido à IgE do paciente 6, o qual também é alérgico a esse fruto. Apesar desse paciente ser alérgico também ao mamão, maçã, látex, abacate e pêssego, através da ferramenta BLAST foram observadas somente

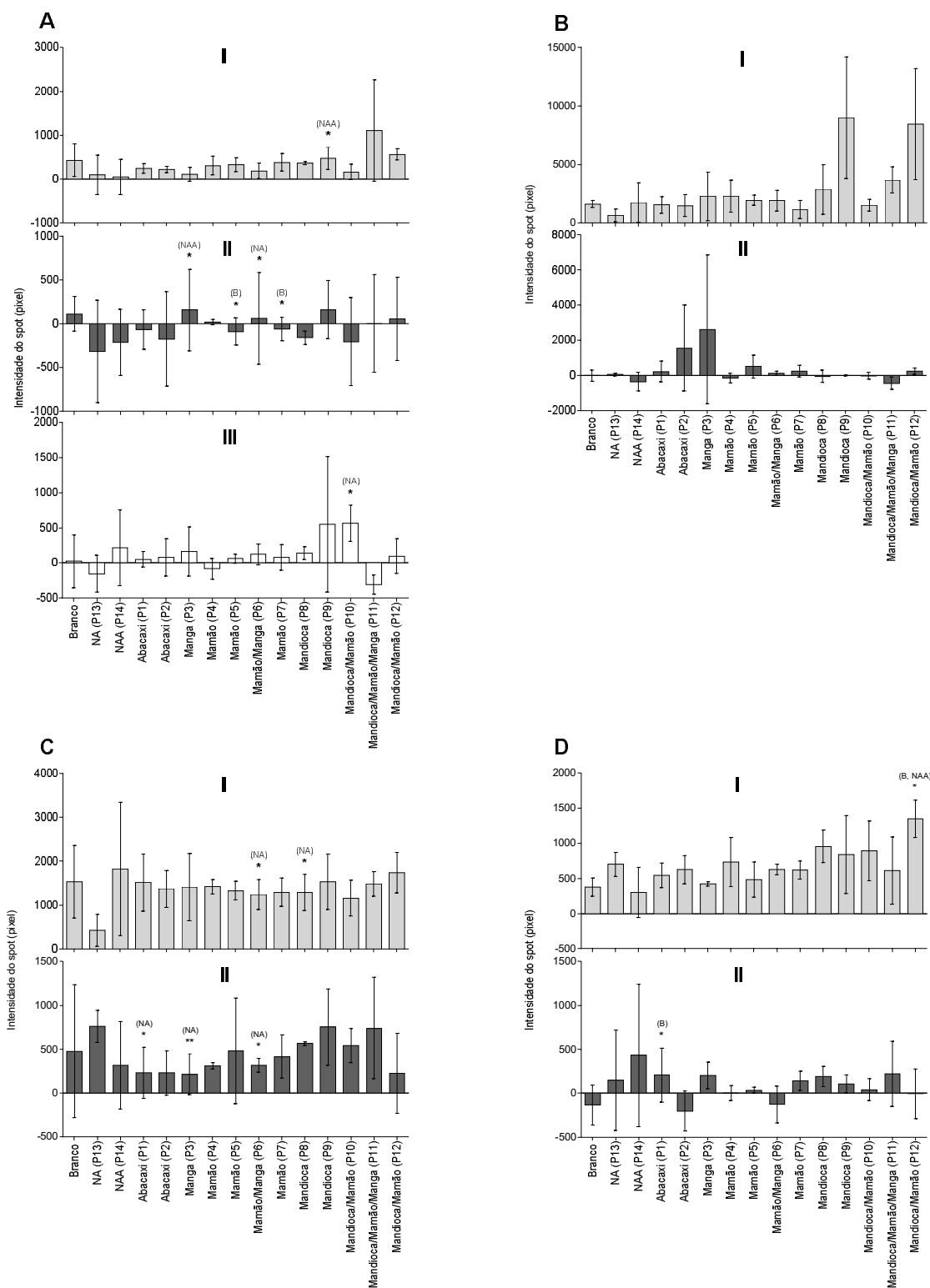
proteínas similares à álcool desidrogenase recombinante para o mamão e látex, contendo, respectivamente, 88% e 87% de identidade em relação à recombinante. Através destes resultados, podemos confirmar a presença de reatividade para as proteínas de manga e látex, conforme já citado e, portanto, de se tratar de um novo alérgeno para esse alimento.

O fato do soro do Paciente 10 ter sido IgE reativo para a fração pico 2 (**Figura 33A-III**) pode confirmar a presença da álcool desidrogenase como alérgeno da mandioca, mamão e látex, uma vez que esse paciente é alérgico a esses três elementos. Pela **Tabela 1** pode-se observar que esse paciente também é alérgico ao kiwi, abacate e banana. Dentre esses três frutos, somente foi encontrada através da BLAST a álcool desidrogenase pertencente ao kiwi, com 87% de identidade em relação à proteína recombinante, sendo que a álcool desidrogenase ainda não foi descrita como alérgeno para o kiwi. Dessa forma, podemos inferir que há reatividade cruzada entre a álcool desidrogenase da mandioca, látex, mamão, manga e kiwi.

#### **4.4.1.3.2 Homocisteína S-metiltransferase**

Em relação à fração pico referente à proteína homocisteína S-metiltransferase (**Figura 33B-II**), apesar de ser observado um sinal de aproximadamente 2623,67 pixels de intensidade para o Paciente 3, alérgico somente à manga, este não apresentou diferença significativa em relação ao branco, NA ou NAA. Além disso, observou-se um pico de 1563,00 pixels de intensidade para o Paciente 2, alérgico somente ao abacaxi. Porém, quando a proteína recombinante é submetida à BLAST, não encontramos proteína similar para o abacaxi. Porém, como há uma proteína similar no milho (GeneBank: AF297044), que é taxonomicamente próximo do abacaxi, pode ser que haja essa proteína neste fruto. Desta maneira, podemos inferir que esta proteína possa ser um alérgeno para esses alimentos, manga e abacaxi.

Apesar disso, observou-se no gráfico referente à fração FT (**Figura 33B-I**), picos relacionados aos Pacientes 9, 11 e 12, os quais são alérgicos, respectivamente, à mandioca e látex; à mandioca, mamão, manga, banana, pêssego e maçã e; à mandioca, mamão, látex, pêssego e batata. Foi observado com a ferramenta BLAST, que a proteína homocisteína S-metiltransferase recombinante é



**Figura 33.** Intensidades da reatividade dos spots (eixo y) referentes às frações FT (barras em cinza claro: A-I, B-I, C-I, D-I), pico 1 (barras em cinza escuro: A-II, B-II, C-II e D-II) e pico 2 (barras em branco: A-III), adquiridos através da purificação dos potenciais alérgenos da manga: álcool desidrogenase (A), homocisteína S-metiltransferase (B), Pequena GTP Rab GDI (C) e tiolase (D), quando incubados com os soros dos quatorze pacientes utilizados nesse estudo (eixo x) (Tabela 1).

Foram utilizadas a coluna His-Tag 5 mL e 5M de ureia para a obtenção das frações. B: Branco. Controles: NA: Paciente não alérgico (Paciente 13) e NAA: Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (Paciente 14). B\*, NA\* e NAA\*: Valores significativos para o Teste T pareado realizado em comparação aos valores gerados através do Branco, Paciente Não alérgico e Paciente não alérgico aos alimentos em estudo, respectivamente.

similar à mesma proteína presente na mandioca, látex, mamão, pêssego e maçã, com 93% de identidade em relação à mandioca, látex, pêssego e maçã e 92% para o mamão. Assim, esse fato poderia confirmar a IgE reatividade dos soros dos pacientes 9, 11 e 12 em relação à homocisteína S-metiltransferase recombinante. Ainda, como esses três pacientes são alérgicos à mandioca, os pacientes 9 e 12 alérgicos ao látex, e os Pacientes 11 e 12 alérgicos ao mamão, podemos inferir que essa proteína seja um novo alérgeno para esses alimentos e para o látex, uma vez que ainda não foi descrita no *Allergome*.

#### 4.4.1.3.3 Pequena GTP Rab GDI

Foi observado na **Figura 33C-I**, que para a fração FT referente à GTP Rab, potencial alérgeno da manga, o Paciente 6, alérgico ao mamão e manga, e o Paciente 8, alérgico à mandioca, mostraram-se estatisticamente significativos quando comparados ao Paciente NA. Porém, em relação à fração pico (**Figura 33C-II**), não foi notada diferença estatística positiva para os Pacientes que não foram utilizados como controle.

Através da **Tabela 1**, foi observado que o Paciente 6 apresenta a síndrome látex-fruta, desta maneira, além dele ser alérgico ao mamão e manga, ele também é alérgico ao látex, maçã, abacate e pêssego. Quando a sequência referente à proteína recombinante foi submetida ao BLAST, foram encontradas proteínas similares para o mamão, látex, maçã e pêssego, denominadas guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor (GDI1), as quais possuem 91%, 93%, 92% e 91% de identidade em relação à recombinante. Esse fato confirma, portanto, a IgE reatividade do soro desse paciente em relação à proteína GTP Rab, além da reatividade cruzada entre esse potencial alérgeno e todos esses elementos, incluindo a manga, já que conforme citado, esse paciente é alérgico à manga.

Para confirmar a IgE reatividade em relação à GTP Rab para o P8, alérgico somente à mandioca, podemos citar a presença da proteína guanosine nucleotide

diphosphate dissociation inhibitor 1 (GDI1) contendo 93% de identidade em relação à recombinante.

Uma vez que as proteínas citadas ainda não foram descritas como alérgenos no *Allergome*, tornam-se bastante promissoras.

É importante citar que pacientes alérgicos ao mesmo alimento podem ser alérgicos a diferentes proteínas desse alimento, ou seja: um paciente X pode reagir a uma dada proteína de um alimento, porém, outro paciente, também alérgico ao mesmo alimento X, pode ter sua alergia desencadeada somente por uma outra proteína Y desse mesmo alimento. Isso justifica o fato de, por exemplo, outros pacientes alérgicos à manga, mamão e mandioca não apresentarem diferença estatística significativa em relação ao branco ou controles para a GTP Rab.

#### 4.4.1.3.4 3-cetoacil CoA tiolase B

Nota-se na **Figura 33D-I** que a fração FT, referente à proteína tiolase, apresentou o Paciente 12, alérgico à mandioca e mamão, como significativo quando comparado ao branco e ao NAA. Além disso, a fração pico (**Figura 33D-II**) apresentou o Paciente 1, alérgico ao abacaxi, como significativo quando comparado ao branco.

Sabe-se que o Paciente 12 tem a síndrome látex-fruta, e é alérgico ao látex, pêssigo, batata e avelã, além de alérgico à mandioca e mamão (**Tabela 1**). Foi observado que a proteína tiolase recombinante possui similaridade com proteínas do látex, batata e mandioca (BLAST). Apesar de não ter sido encontrada proteína semelhante para o pêssigo (*Prunus persica*) ou avelã (*Prunus dulcis*), foram encontradas proteínas semelhantes para o damasco (*Prunus mume*) e para a cereja (*Prunus avium*), com identidades de 85% e 83%, respectivamente. Como estes dois últimos frutos pertencem ao mesmo gênero do pêssigo e avelã, é muito provável que proteína semelhante seja encontrada também no pêssigo e avelã. Desta maneira, a similaridade entre as proteínas encontradas nos alimentos citados acima, poderia justificar a IgE reatividade do soro do Paciente 12 em relação à tiolase recombinante, e ainda, a síndrome látex-fruta do mesmo, mostrando a reatividade cruzada entre a tiolase de todos estes alimentos e o látex.



Foi verificado na plataforma de alérgenos que a tiolase ainda não foi descrita para nenhum dos alimentos citados acima, tornando-se uma proteína importante. Através da BLAST não foi encontrada proteína semelhante à recombinante para o abacaxi. Além disso, essa proteína ainda não foi observada nesse alimento. Desta maneira, nenhuma conclusão sobre a IgE reatividade do soro do Paciente 1 em relação à tiolase pode ser informada.

#### 4.4.1.4 Mamão

##### 4.4.1.4.1 Ascorbato peroxidase 2

Conforme observado na **Figura 34A-I**, o Paciente 1, alérgico ao abacaxi, e o Paciente 7, alérgico ao mamão, tiveram a intensidade do *spot* significativa quando comparados ao NAA. Além disso, como mostrado na **Figura 34A-III**, o Paciente 11, alérgico à mandioca, mamão e manga, e o Paciente 12, alérgico à mandioca e mamão, mostraram valores referentes às intensidades dos *spots* significativos quando comparados ao NAA e NA, respectivamente.

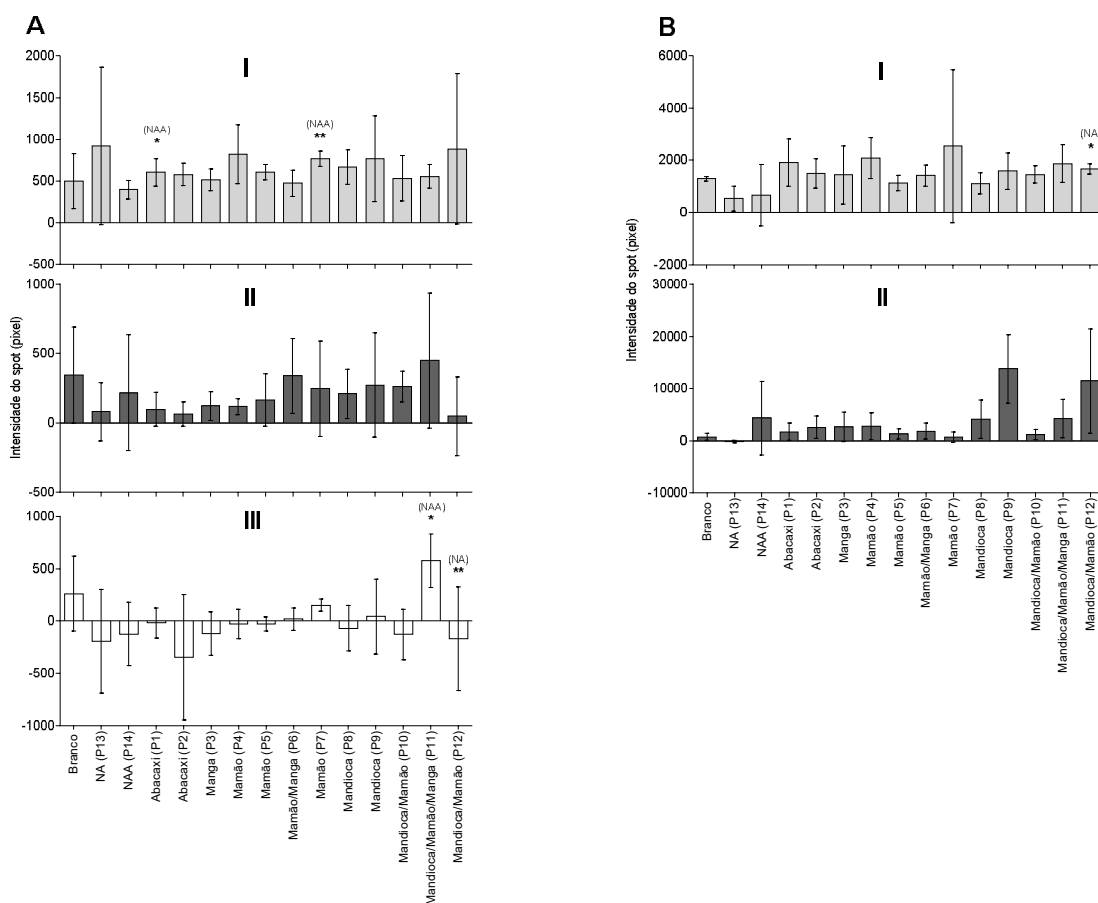
Através da reatividade do Paciente 7 à ascorbato peroxidase recombinante, podemos inferir que foi identificada uma nova proteína potencialmente alergênica para o mamão. Reforçando essa hipótese, temos o fato de que os Pacientes 11 e 12 também são alérgicos ao mamão e apresentaram também marcações significativas para essa proteína.

Pode-se explicar a reatividade do soro do Paciente 1, alérgico ao abacaxi, à ascorbato peroxidase recombinante, pelo fato de haver no abacaxi uma L-ascorbato peroxidase com 91% de identidade em relação à recombinante (BLAST).

É interessante comentar que quando a ascorbato peroxidase é analisada com a BLAST, verificamos proteínas com sequências similares para a mandioca, pêssego, maçã, banana, batata e látex, contendo 87%, 90%, 92%, 91%, 92% e 89% de identidade, respectivamente. Esse fato justifica a reatividade da IgE do Paciente 11, sendo este alérgico também à mandioca, pêssego, maçã e banana, e do Paciente 12, também alérgico à mandioca, pêssego, látex e batata. Este último apresentou a síndrome látex-fruta, assim, esta reação justificaria a reatividade

cruzada dessa proteína em relação a esse paciente, além de justificar a reação do soro do Paciente 12 com os alimentos a que este é alérgico.

Uma vez que a ascorbato peroxidase ainda não foi descrita no *Allergome* para os alimentos citados acima, podemos inferir que esta seja um novo potencial alérgeno para estes organismos.



**Figura 34.** Intensidades da reatividade dos spots (eixo y) referentes às frações FT (barras em cinza claro: I), pico 1 (barras em cinza escuro: II) e pico 2 (barras em branco: III) adquiridos através da purificação dos potenciais alérgeno do mamão: ascorbato peroxidase 2 (A) e germina-like (B), quando incubados com os soros dos quatorze pacientes utilizados nesse estudo (eixo x) (Tabela 1). Foram utilizadas a coluna His-Tag 5 mL e 5 M de ureia para a obtenção das frações. P: Paciente. Controles: NA - Paciente não alérgico (Paciente 13) e NAA - Paciente não alérgico aos alimentos em estudo (Paciente 14). B\*, NA\* e NAA\*: Valores significativos para o Teste T pareado realizado em comparação aos valores gerados através do Branco, Paciente Não alérgico e Paciente não alérgico aos alimentos em estudo, respectivamente.

#### 4.4.1.4.2 Germina-like

Para a germina-like, podemos observar na **Figura 34B-I**, que o Paciente 12, alérgico à mandioca e ao mamão, teve o valor significativo para a intensidade da marcação

referente à fração FT, quando comparado ao Paciente não-alérgico (NA). Já em relação à fração pico (**Figura 34B-II**), podemos observar valores altos para as marcações referentes ao Paciente 9 (~13800 pixels), alérgico à mandioca e látex, e ao Paciente 12 (~11500 pixels), apesar de não ser observada diferença significativa em relação ao Branco, NA ou NAA.

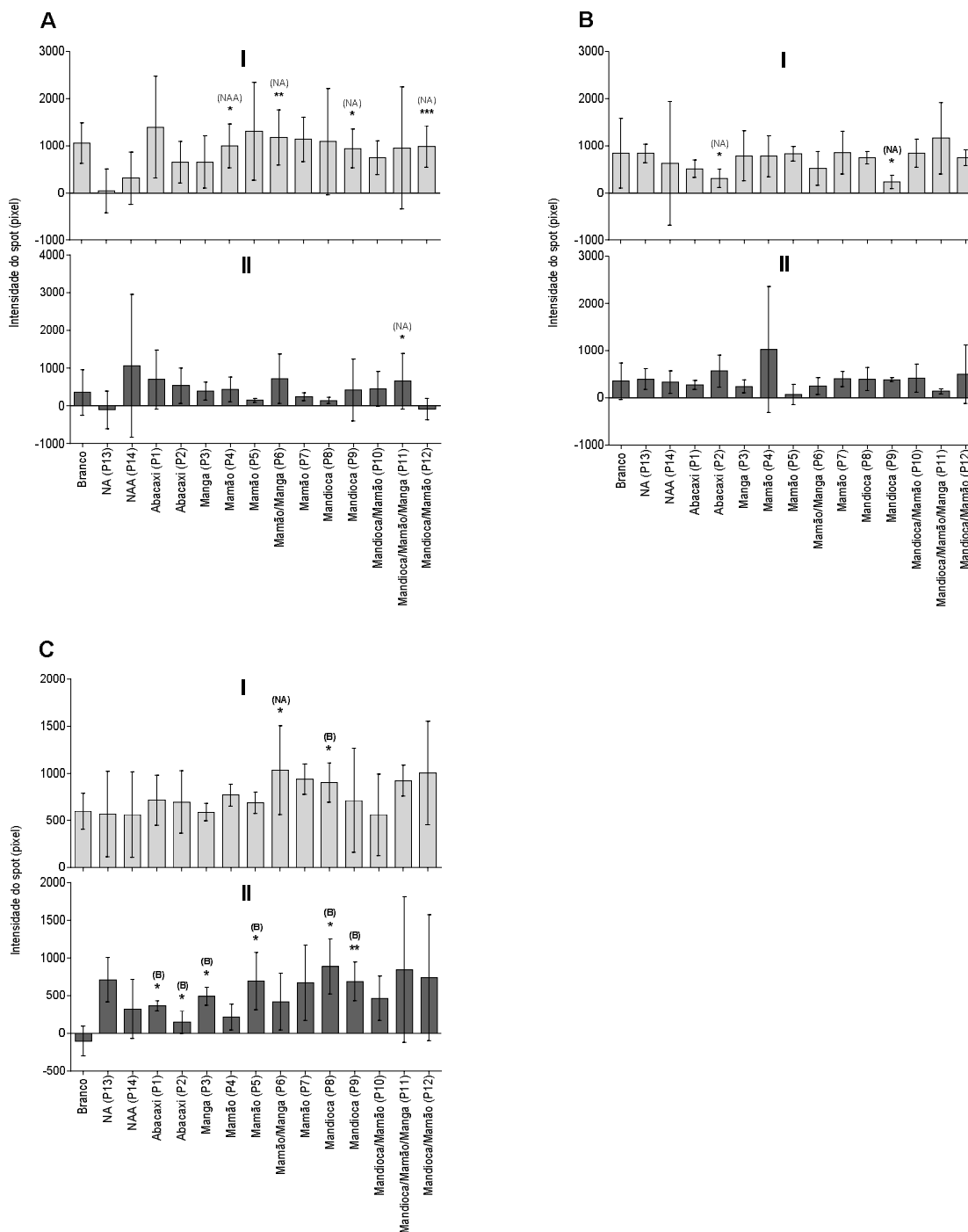
Através destes resultados, podemos inferir que a germina-like recombinante é um novo alérgeno para o mamão. Além disso, por meio da BLAST, podemos encontrar sequências semelhantes à da germina-like recombinante para a mandioca e látex, contendo, respectivamente, 76% e 77% de identidade, comprovando a reatividade de IgE para os soros dos pacientes 9 e 12. Ainda, esses dados podem mostrar a reatividade cruzada entre as proteínas do mamão, mandioca e látex, ocorrida no Paciente 12, e entre a mandioca e látex, pertencente ao Paciente 9.

Desta forma, concluímos que a germina-like é um provável alérgeno para o mamão, mandioca e látex, ainda não descrito no Allergome.

#### **4.4.1.4.3 Peroxirredoxina**

Podemos observar na **Figura 35A-I**, que o Paciente 4, alérgico ao mamão, teve diferença significativa em relação a marcação referente à fração FT para a proteína peroxirredoxina, quando comparado ao Paciente NAA. Ainda, na mesma figura, o Paciente 6, alérgico ao mamão e manga, o Paciente 9, alérgico à mandioca, e o Paciente 12, alérgico ao mamão e mandioca, tiveram suas marcações significativas quando comparadas ao Paciente não-alérgico (NA). Além disso, na **Figura 35A-II**, foi observado que o Paciente 11, alérgico ao mamão, mandioca e manga, foi estatisticamente significativo quando comparado ao NA em relação à fração pico para a peroxirredoxina recombinante. Desta maneira, podemos inferir que a peroxirredoxina é um novo alérgeno para o mamão, já que ela reagiu com a IgE de quatro dos sete pacientes alérgicos a esse fruto.

É importante ressaltar que a peroxirredoxina recombinante é similar à peroxirredoxina encontrada na mandioca, látex, pêssego, maçã, cenoura e batata, respectivamente, contendo 88%, 88%, 79%, 78%, 77% e 77% de identidade. Como visto na **Tabela 1**, o Paciente 4 também é alérgico à cenoura, o Paciente 6 é alérgico ao látex, maçã e pêssego, Paciente 9, conforme já mencionado, é alérgico à



**Figura 35.** Intensidades da reatividade dos spots (eixo y) referentes às frações FT (barras em cinza claro: I) e pico (barras em cinza escuro: II) adquiridos através da purificação dos potenciais alérgenos do mamão: peroxirredoxina (A), PR (B), e tiorredoxina (C), quando incubados com os soros dos quatorze pacientes utilizados nesse estudo (eixo x) (**Tabela 1**). Foram utilizadas a coluna His-Tag 5 mL e 5 M de ureia para a obtenção das frações. P: Paciente. Controles: NA - Paciente não-alérgico (Paciente 13) e NAA - Paciente não-alérgico aos alimentos em estudo (Paciente 14). B\*, NA\* e NAA\*: Valores significativos para o Teste T pareado realizado em comparação aos valores gerados através do Branco, Paciente não alérgico e Paciente não alérgico aos alimentos em estudo, respectivamente.

mandioca, Paciente 11, à mandioca, pêssigo e maçã, e Paciente 12, mandioca, pêssigo, látex e batata. Dessa forma, podemos inferir que a reatividade cruzada entre esses alimentos é devido a semelhança entre essas proteínas. Além disso, essa proteína pode caracterizar a síndrome látex-fruta dos Pacientes 6 e 12. Ainda é importante comentar a reatividade de IgE do soro do Paciente 9, o qual é alérgico somente à mandioca, confirmando, portanto, que essa proteína é um potencial alérgeno para esse alimento.

Concluímos, portanto, que a peroxirredoxina é um potencial alérgeno para todos os alimentos citados acima e para o látex, já que ainda não foi descrita no *Allergome*.

#### 4.4.1.4.4 PR

Apesar da proteína PR recombinante não ter apresentado diferença significativa em relação ao Branco, NA ou NAA para ambas as frações FT (**Figura 35B-I**) e pico (**Figura 35B-II**), foi observado um valor alto para a marcação referente à fração pico para o Paciente 4, alérgico ao mamão.

De acordo com a **Tabela 1**, o Paciente 4 também é alérgico à cenoura. Foi encontrada na BLAST uma proteína relacionada à patógeno da cenoura similar à PR recombinante, com 77% de identidade. Dessa forma, podemos concluir que há reatividade cruzada entre esses dois alimentos, e que a PR é um novo alérgeno para ambos, uma vez que ainda não foi descrito na literatura.

#### 4.4.1.4.5 Tiorredoxina

Conforme observado na **Figura 35C-I**, o Paciente 6, alérgico ao mamão e manga, e o Paciente 8, alérgico somente à mandioca, tiveram suas marcações referentes à fração FT para a tiorredoxina significativas quando comparadas à do Paciente NA e ao Branco, respectivamente. Além disso, para a fração pico (**Figura 35C-II**), os Pacientes 1 e 2, alérgicos ao abacaxi, o Paciente 3, alérgico à manga, o Paciente 5, alérgico ao mamão e os Pacientes 8 e 9, alérgicos à mandioca, apresentaram diferença significativa quando comparados ao Branco. Desta forma, podemos concluir que a tiorredoxina recombinante é um novo potencial alérgeno

para o mamão, já que reagiu com a IgE dos Pacientes 5 e 6, alérgicos a esse alimento. Essa informação pode ser sustentada pelo fato de que o P5, é alérgico somente ao mamão, comprovando a reatividade de IgE para a proteína desse fruto.

Através da BLAST, foram encontradas proteínas similares à tiorredoxina recombinante para a mandioca, látex e kiwi, contendo 77%, 75% e 74% de identidade. É importante ressaltar que para a mandioca e látex foram encontradas diversas isoformas semelhantes à tiorredoxina recombinante. Esses dados podem evidenciar a reatividade de IgE dos soros do Paciente 1, alérgico também ao kiwi, Paciente 6, alérgico também ao látex, Paciente 8, alérgico somente à mandioca, e Paciente 9, alérgico à mandioca e látex. Assim, como ainda a tiorredoxina não foi descrita como alérgeno do kiwi e mandioca, essa pode ser um novo potencial alérgeno para esses alimentos.

Quando alinhamos a tiorredoxina já descrita no *Allergome* para o látex, Hev b Trx, com a proteína do látex encontrada através da BLAST similar à tiorredoxina recombinante para o mamão, encontramos uma cobertura de 29%, com 27% de identidade. Dessa forma, podemos inferir que uma nova tiorredoxina foi encontrada como potencial alérgeno do látex.

Como vimos para a tiorredoxina selecionada como potencial para a mandioca (**Item 4.4.1.2.2**), essa superfamília de proteínas mostrou-se ser alergênica para a mandioca, látex e também para o mamão, reagindo significativamente com a IgE dos Pacientes 6 (alérgico ao mamão e látex), 8 (alérgico somente à mandioca) e 9 (mandioca e látex). Esses dados comprovam que a superfamília tiorredoxina é um potencial alérgeno para o mamão, mandioca e látex, uma vez que esses pacientes também foram significativos para a tiorredoxina recombinante selecionada para o mamão, conforme já mencionado. Apesar disso, quando alinhamos a tiorredoxina selecionada como potencial alérgeno da mandioca com a tiorredoxina selecionada para o mamão na BLAST, encontramos uma cobertura de 8% contendo 100% de identidade, mostrando que essas proteínas possuem sequências diferentes.

## 5 DIFICULDADES E CUIDADOS

Apesar do sucesso da estratégia utilizada neste trabalho, como visto anteriormente, algumas dificuldades inerentes a esse tipo de abordagem foram enfrentadas.

Em relação à abordagem *in silico*, o levantamento taxonômico demandou bastante tempo devido à consulta de todas as espécies mais aparentadas àquelas em estudo sobre as quais deveria ser feito o levantamento dos alérgenos já descritos no *Allergome*. Além disso, esse levantamento gerou um grande volume de dados, de difícil análise e depuração de informações.

Em relação ao *2-D WB*, a principal dificuldade surgida foi a grande quantidade de replicatas de géis que foi confeccionada para o sequenciamento das proteínas contidas nos *spots*. Conforme já mencionado, para o devido sequenciamento foram feitas 8 replicatas de géis para que tivéssemos 8 replicatas de cada um dos *spots* IgE reativos, de modo a resultar em uma grande quantidade de proteínas que possibilitasse uma análise do sequenciamento mais confiável.

Outra dificuldade importante foi sobre a escolha das proteínas a serem expressas em *Pichia*, devido ao grande número de potenciais alérgenos apontados pela combinação entre as abordagens *in silico* e *2-D WB*.

Além disso, visando à qualidade da análise final, um grande número de *microrrays* manuais e *Dot Blots* foram realizados antes da confecção dos *arrays* automatizados

A purificação dos alérgenos foi uma etapa em que tivemos que testar mais de uma coluna de separação e diversas soluções com diferentes reagentes e concentrações, conforme citado, verificando as melhores condições de purificação através do ÄKTA FPLC e também usando a coluna de fase reversa, para que as proteínas expressas fossem devidamente purificadas. Após diversos testes, acabamos, por fim, utilizando para todas as nossas proteínas o ÄKTA FPLC acoplado à coluna HisTag de 5 mL usando 5 M de ureia e 400 mM de imidazol como tampão de eluição. A alta concentração de ureia, agente caotrópico, permitiu a devida solubilização das proteínas a partir do rompimento das interações hidrofóbicas. Percebemos que este foi o melhor método de purificação, pois através da combinação da coluna HisTag com 5 M de ureia conseguimos visualizar picos

para todas as nossas proteínas recombinantes, as quais apresentavam cauda de histidina. Apesar disso, ao final da purificação, todas as frações geradas (*flow-through* e picos) através dos outros métodos testados foram adicionadas ao *microarray* automatizado para a devida validação dos alérgenos.

Por fim, o escaneamento dos *arrays* gerou um grande número de dados a serem analisados, demandando muito tempo para que todos os resultados fossem discutidos. Como observado, um grande número de frações a partir da purificação dos potenciais alérgenos foi gerado.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Géis bidimensionais vem sendo utilizados com sucesso para a descoberta de novos alérgenos, constituindo uma abordagem clássica para essa finalidade (MEI-CHANG et al., 1993; BEYER et al., 2002; MAGNI et al., 2005). Além disso, a predição de novos alérgenos também tem sido feita através da comparação por meio de *softwares* de sequências e estruturas tridimensionais de proteínas com alérgenos já conhecidos (GUARNERI, GUARNERI, BENVENGA, 2005; GUARNERI et al., 2006). Porém, a previsão de potenciais alérgenos através da proximidade taxonômica, a partir da análise *in silico*, como foi feito neste trabalho, constitui-se em uma abordagem mais recente e inovadora, capaz de antecipar um número maior de candidatos a alérgenos para uma análise mais apurada. Como confirmado pelo estudo simultâneo de quatro alimentos alergênicos com essa abordagem, a estratégia utilizada, combinando o *2-D WB* com soro dos pacientes alérgicos com a análise *in silico*, utilizando como ponto de partida a árvore filogenética, revelou um expressivo número de proteínas potencialmente alergênicas.

Conforme mostrado anteriormente, a estratégia aplicada nesse estudo para a descoberta de potenciais novos alérgenos foi uma técnica de sucesso, já que conseguimos identificar potenciais novos alérgenos, conforme nossa hipótese inicial, e ainda obtivemos resultados em relação à reatividade cruzada. Esta última permite acelerar o diagnóstico em relação à alergia alimentar, uma vez que mostra a sensibilização para alérgenos de outros alimentos e organismos.

## REFERÊNCIAS

- ALLERGY & AUTOIMMUNITY. **ImmunoCAP®ISAC**. Thermo Scientific, 2015. 60 p. Product Catalog.
- ANDRADE et al. 2D-DIGE analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit reveals major proteomic changes associated with ripening. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 11, p. 3331-3341, 2012.
- BAUD, F. et al. Crystal structure of hydrophobic protein from soybean; a member of a new cysteine-rich family. **Journal of Molecular Biology**, v. 231, n. 3, p. 877-887, 1993.
- BERND, L. A. G. et al. Anafilaxia: guia prático para o manejo. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 29, n. 6, p. 283-291, 2006.
- BEYER, et al. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, p. 517-523, 2002.
- BOYCE, J. A. et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 6, p. 1105-1118, 2010.
- BRADESON et al. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity. **Nature biotechnology**, v.34, n.5, p. 562-70, 2016.
- BREITENEDER, H; MILLS, E. N. Molecular properties of food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.115, n. 1, p. 14-23, 2005.
- BREITENEDER, H.; MILLS, C. Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, n. 3, p. 275-279, 2005.
- BREITENEDER, H.; RADAUER, C. A classification of plant food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 821-830, 2004.
- BROETTO, S. G.; FABRI, J. P.; NASCIMENTO, J. R. O. Cloning and expression analysis of two putative papaya genes encoding polygalacturonase-inhibiting proteins. **Postharvest Biology and Technology**, v. 104, p. 48-56, 2015.
- CANONICA, G. W. et al. A WAO – ARIA - GA<sup>2</sup>LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. **World Allergy Organization Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2013.

CARPENTIER, S.C. et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2497-2507, 2005.

CHAFEN, J. J. et al. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. **Journal of the American Medical Association**, v. 303, n. 18, p. 1848-1856, 2010.

CHASSAIGNE, H. et al. Resolution and identification of major peanut allergens using a combination of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis, Western blotting and Q-TOF mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 511-526, 2009.

COLVER, A. F. et al. Severe foodallergic reactions in children across the UK and Ireland, 1998–2000. **Acta Paediatrica**, v. 94, n. 6, p. 689-695, 2005.

DEBROSSE, C. W. et al. Long-term outcomes in pediatric-onset esophageal eosinophilia. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 1, p. 132-138, 2011.

DUNWELL, J. M. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 1, p. 1-32, 1998.

FERRER, M. et al. Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, n. 1, p. 19-24, 2009.

GAGNON, C. et al. Soybean allergens affecting North American patients identified by 2D gels and mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 4, p. 363-374, 2010.

GUARNERI, F.; GUARNERI, C.; BENVENGA, S. Identification of potentially cross-reactive peanut-lupine proteins by computer-assisted search for amino acid sequence homology. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 138, p. 273, 2005.

GUARNERI, F. et al. In silico identification of potential new latex allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 916, 2006.

HOLGATE, S. T.; CHURCH, M. K.; LICHTENSTEIN, L. M. **Allergy**. Third Edition. Mosby Elsevier, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MAGNI, et al. Two-Dimensional Electrophoresis and Western-Blotting Analyses with anti Ara h 3 Basic Subunit IgG Evidence the Cross-Reacting Polypeptides of *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, and *Lupinus albus* Seed Proteomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2275-2281, 2005.

MEI CHANG, et al. Purification and immunochemical characterization of recombinant and native ragweed allergen Amb a II. **Molecular Immunology**, v. 30, p.1077-1087, 1993.

MING, R. et al. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). **Nature**, v. 452, n. 7190, p.991-996, 2008.

MING, R. et al. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. **Nature Genetics**, v. 47, n. 12, p. 1445-1435-1442, 2015.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255–262, 1988.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **Electrophoresis**, 1985, v. 6, p. 427–448, 1985.

PALACÍN, A. et al. Graph Based Study of Allergen Cross-Reactivity of Plant Lipid Transfer Proteins (LTPs) Using Microarray in a Multicenter Study. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. 1-10, 2012.

PANDEY, V. P. et al. Purification and Characterization of Peroxidase from Papaya (*Carica papaya*) Fruit. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 367-376, 2012.

PASTORELLO, E. A. et al. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. **Allergy**, v. 56, n. 67, p. 45-47, 2001.

RADAUER, C.; BREITENEDER, H. Evolutionary biology of plant food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 3, p. 518-525, 2007.

RADAUER, C. et al. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 36, n. 7, p. 920-929, 2006.

ROSS, M. P. et al. Analysis of food-allergic and anaphylactic events in the National Electronic Injury Surveillance System. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 1, p. 166-171, 2008.

SANTOS, K. S. et al. Allergic reactions to manioc (*Manihot esculenta* Crantz): Identification of novel allergens with potential involvement in latex-fruit syndrome. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. New York: Mosby-elsevier, v. 128, n. 6, p. 1367-1369, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/19766>>.

SCHMITZ, G. J. H et al. Comparative Proteome Analysis of the Tuberos Roots of Six Cassava (*Manihot esculenta*) Varieties Reveals Proteins Related to Phenotypic Traits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 16, p. 3293-3301 2016.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2856-2860, 2007.

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

SILAS, P. R. et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* L. plants. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 3192-3198, 2012.

SILVA, I. L. et al. Paediatric anaphylaxis: a 5 year retrospective review. **Allergy**, v. 63, n. 8, p. 1071-1076, 2008.

SINGH, A et al. A Draft Genome of the King of Fruit, Mango (*Mangifera indica* L.). **Plant and Animal Genome**. Plant and Animal Genome XXII Conference, 2014.

SOUSA, R. et al. Identification of *Plantago lanceolata* pollen allergens using an immunoproteomic approach. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 24, n. 3, p. 177-183, 2014.

TAFOLLA-ARELLANO, J. C. et al. Transcriptome Analysis of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit Epidermal Peel to Identify Putative Cuticle-Associated Genes. **Scientific Reports**, v. 7, , p. 1-13, 2017.

VALE, E. M. et al. Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. **Proteome Science**, v. 12, n. 37, p. 1-17, 2014.

VIETHS, S.; SCHEURER, S.; BALLMER-WEBER, B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 964, p. 47-68, 2002.

WANG, X. et al. Proteomics Profiling Reveals Carbohydrate Metabolic Enzymes and 14-3-3 Proteins Play Important Roles for Starch Accumulation during Cassava Root Tuberculation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-15, 2016.

WINKLE, R. C. V; CHANG, C. The Biochemical Basis and Clinical Evidence of Food Allergy Due to Lipid Transfer Proteins: A Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 46, n. 3, p. 211-224, 2014.

WOO, E.J. et al. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 7, n. 11, p. 1036-1040, 2000.

## APÊNDICE A – Proteínas identificadas através do 2-D Western Blotting

**Tabela 2.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **abacaxi** (continua)

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score da proteína	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi	Phytozome ( <i>Ananas comosus</i> )	6	ATPase, V1 complex, subunit B protein; ATP synthase	33054765	23121140	56.11	9	25.79	N
			16	CPN60B,LEN1; chaperonin 60 beta; T-complex protein	33046359	12154560	64.86	7	17.76	N
				HSP60,HSP60-3B heat shock; T-complex protein	33033868	7109175	61.41	5	11.83	N
				ATP synthase alpha/beta family; ATP synthase	33047066	1561735	59.52	4	8.42	N
			17	AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1 heat shock cognate protein 70-1; DnaK family protein	33047886	77263670	71.33	19	40.06	N
				VHA-A vacuolar ATP synthase subunit A; ATP synthase	33052052	23401910	68.89	15	32.85	N
				ENO2,LOS2 Enolase	33040999	1405900	48.33	2	6.97	S
			18	VHA-A vacuolar ATP synthase subunit A; ATP synthase	33052052	47866990	68.89	18	37.20	N
				AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1; heat shock cognate protein 70-1; DnaK family protein	33047886	26239070	71.33	14	29.12	N
			19	ENO2,LOS2 Enolase	33040999	46540600	48.33	11	37.30	S
				HSP60,HSP60-3B heat shock protein 60; T-complex protein	33035638	13926860	63.19	8	18.00	N
				ATP synthase alpha/beta family; ATP synthase	33047066	9712221	59.52	9	20.97	N

S: SIM / N: NÃO

**Tabela 2.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **abacaxi** (continuação)

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi	Phytozome ( <i>Ananas comosus</i> )	20	ENO2,LOS2 Enolase	33040999	67086220	48.33	20	60.00	<b>S</b>
				ATP synthase subunit 1	33037709	21527540	55.39	8	15.94	N
				HSP60,HSP60-3B heat shock protein 60; T-complex protein	33035638	16368050	63.19	9	21.73	N
			21	ENO2,LOS2 Enolase	33040999	63242650	48.33	20	67.19	<b>S</b>
				ATP synthase subunit 1	33037709	27848940	55.39	10	20.87	N
				ENO1 enolase 1	33040829	2938714	50.46	4	9.83	<b>S</b>
			22	ENO2,LOS2 Enolase	33040999	83675880	48.33	15	49.66	<b>S</b>
				ATP synthase alpha/beta family protein	33047066	2784655	59.53	5	10.93	N
			26	ENO2,LOS2 Enolase	33040999	57386580	48.33	19	58.65	<b>S</b>
				HPD,PDS1 phytoene desaturation 1; glyoxalase family protein	33052048	2018333	54.84	4	9.82	<b>S</b>
				ENO1 enolase 1	33040829	791635	50.46	3	6.41	<b>S</b>
			27	ENO2,LOS2 Enolase	33040999	50017440	48.33	17	53.03	<b>S</b>
				Peptidase M20/M25/M40 family protein; Hydrolase	33031983	8240308	50.46	6	16.09	N
				non-specific phospholipase C4; phosphoesterase family protein	33036164	2797708	58.69	7	14.97	N

**Tabela 2.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **abacaxi** (continuação)

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi	Phytozome ( <i>Ananas comosus</i> )	32	ENO2,LOS2 Enolase	33040999	26377890	48.33	7	27.87	<b>S</b>
				AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1 heat shock cognate protein 70-1; DnaK family protein	33047886	10131650	71.33	10	21.11	N
				VHA-A vacuolar ATP synthase subunit; ATP synthase	33052052	5745596	68.89	8	17.39	N
			33	ENO2,LOS2 Enolase	33040999	12779910	48.33	2	8.54	<b>S</b>
				Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	33050657	11725820	66.07	9	22.26	N
				tolB protein-related; WD40-like Beta Propeller Repeat family protein	33029111	3411376	69.90	5	12.40	N
			34	tolB protein-related; WD40-like Beta Propeller Repeat family protein	33029111	31374010	69.90	13	27.75	N
				ENO2,LOS2 Enolase	33040999	5875551	48.33	2	8.54	<b>S</b>
				Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	33050657	3746618	66.07	4	10.47	N
			36	ATCIMS,ATMETS,ATMS1 Cobalamin-independent synthase family protein; 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	33033989	12440830	85.04	16	27.94	N
				tolB protein-related; WD40-like Beta Propeller Repeat family protein	33029111	5102269	69.90	8	20.00	N



**Tabela 2.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **abacaxi** (continuação)

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi	Phytosome ( <i>Ananas comosus</i> )	37	ATCIMS,ATMETS,ATMS1 Cobalamin-independent synthase family protein; 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	33033989	32985990	85.04	23	40.08	N
				tolB protein-related; WD40-like Beta Propeller Repeat family protein	33029111	8652410	69.90	12	30.54	N
				Purple acid phosphatases superfamily protein; nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	33034233	5405884	119.91	9	10.52	S
			38	ATCIMS,ATMETS,ATMS1 Cobalamin-independent synthase family protein; 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	33033989	25166160	85.04	22	38.51	N
				Purple acid phosphatases superfamily protein; nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	33034233	494958	119.91	5	3.54	S
			39	ACO3 aconitase 3; aconitate hydratase protein	33035571	7375412	109.16	13	18.74	N
				Glycosyl hydrolases family 31	33052381	2040279	207.12	7	5.11	N
			40	ACO3 aconitase 3; aconitate hydratase protein	33039464	5501797	109.07	13	15.39	N
			47	AtUGP1,UGP,UGP1 UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1; UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	33048677	35814010	49.26	16	44.64	N
				HXXXD-type acyl-transferase family protein ; transferase family protein	33054192	5742627	51.81	3	7.49	N
				Peroxidase superfamily protein ; peroxidase precursor	33052004	1465708	37.31	2	8.11	S

**Tabela 2.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **abacaxi** (continuação)

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi	Phytosome ( <i>Ananas comosus</i> )	49	Peroxidase superfamily protein; peroxidase precursor	33052004	75201090	37.31	11	45.35	<b>S</b>
				6-phosphogluconate dehydrogenase family protein ; 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	33045905	30801550	53.64	14	39.18	N
			50	AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1 heat shock cognate protein 70-1 ; DnaK family protein	33047886	59405980	71.33	19	40.99	N
				Peroxidase superfamily protein ; peroxidase precursor	33052004	15531270	37.31	6	31.83	<b>S</b>
				Leucine-rich repeat (LRR) family protein	33027908	1840071	51.90	4	9.66	<b>S</b>
			53	mMDH1 Lactate/malate dehydrogenase family protein	33034914	128076500	36.93	11	62.25	N
				GAPC-2,GAPC2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	33051457	16791420	31.71	3	13.79	<b>S</b>
				Pectin lyase-like superfamily protein ; polygalacturonase	33054250	2351952	45.44	2	9.05	<b>S</b>
			59	GAPC-2,GAPC2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	33051457	96729800	31.71	13	63.10	<b>S</b>
				Aldolase superfamily protein ; fructose-bisphosphate aldolase isozyme	33050816	79229790	39.05	11	39.11	N
				Peroxidase superfamily protein ; peroxidase precursor	33052829	69985130	34.50	7	33.86	<b>S</b>

**Tabela 2.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **abacaxi** (conclusão)

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi	Phytozome ( <i>Ananas comosus</i> )	60	GAPC-2,GAPC2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	33051457	127516700	31.71	17	68.97	<b>S</b>
				Aldolase superfamily protein; fructose-bisphosphate aldolase isozyme	33050816	40825160	39.00	11	39.11	N
				Peroxidase superfamily protein ; peroxidase precursor	33052829	12644260	34.50	6	31.97	<b>S</b>
			63	GAPC-2,GAPC2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	33051457	66489920	31.71	9	46.55	<b>S</b>
				ALDH7B4 aldehyde dehydrogenase 7B4	33036874	29370870	61.87	14	39.51	N
			65	GAPC-2,GAPC2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	33051457	67265280	31.71	9	51.03	<b>S</b>
				mtLPD1 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1; dihydrolipoyl dehydrogenase 1	33047895	36289450	25.99	8	38.40	N
				Purple acid phosphatases superfamily protein ; nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	33034233	678447	119.91	2	2.01	<b>S</b>

**Tabela 3.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **mamão** (continua).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Carica papaya</i>	Mamão	Phytozome ( <i>Carica papaya</i> )	2	cpHsc70-2, CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70-2, HSC70-7 chloroplast heat shock protein 70-2	16406045	45106060	76.47	19	30.20	N
				DC1 domain-containing protein	16424926	13082480	66.48	15	32.01	N
			3	BIP, BIP2 Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	16409311	322694400	73.55	23	41.65	N
			5	ENO2, LOS2 Enolase	16421539	251568200	42.21	18	61.56	N
				ATP synthase alpha/beta family protein	16424511	152343000	60.12	23	59.11	N
				HSP60, HSP60-3B heat shock protein 60	16423207	53679720	48.27	17	45.13	N
			6	ENO2, LOS2 Enolase	16421539	106313200	42.21	16	58.44	N
				ATP synthase alpha/beta family protein	16424511	86705560	60.12	25	65.54	N
				HSP60, HSP60-3B heat shock protein 60	16423207	31077820	48.28	15	40.27	N
			12	AtSAM2, MAT2, SAM-2, SAM2 S-adenosylmethionine synthetase 2	16424756	331590900	44.02	18	66.16	N
				AGAL1, AtAGAL1 alpha-galactosidase 1	16426167	230550000	46.01	13	38.29	N
				PGK phosphoglycerate kinase	16421937	193183300	42.77	17	64.43	N
				Cysteine proteinases superfamily protein	16419321	83369840	40.94	13	39.50	<b>S</b>

**Tabela 3.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **mamão** (continuação).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Carica papaya</i>	Mamão	Phytozome ( <i>Carica papaya</i> )	18	AtSAM2, MAT2, SAM-2, SAM2 S-adenosylmethionine synthetase 2	16424756	51264880	44.02	11	47.22	N
				TAPX thylakoidal ascorbate peroxidase	16424172	13236810	15.79	5	48.94	S
				APX1B, APX2 ascorbate peroxidase 2	16429847	11987970	27.75	7	34.00	S
				XBCP3 xylem bark cysteine peptidase 3	16424992	2838578	47.92	4	16.63	S
				SAPX stromal ascorbate peroxidase	16424173	2542237	23.70	2	7.31	S
				Thioredoxin superfamily protein	16408734	2344829	27.49	6	23.33	S
			19	ATGSTU19, GST8, GSTU19 glutathione S-transferase TAU 19	16426063	64069440	25.54	10	35.32	N
				pathogenesis-related family protein	16426072	51669380	35.57	8	44.39	S
				APX1B, APX2 ascorbate peroxidase 2	16429847	4767550	27.75	4	24.00	S
			37	ATPRXIIF, PRXIIF peroxiredoxin IIF	16409192	96599710	21.92	8	50.25	S
				AT-RAB2, ATRAB-B1B, ATRAB2A, ATRABB1C, RAB-B1B, RAB2A, RABB1C RAB GTPase homolog B1C	16415573	77639530	23.44	10	50.71	N
				ATGPX6, GPX6, LSC803, PHGPX glutathione peroxidase 6	16425710	10942630	26.60	7	34.03	S

**Tabela 3.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **mamão** (continuação).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Carica papaya</i>	Mamão	Phytozome ( <i>Carica papaya</i> )	43	HXXXD-type acyl-transferase family protein	16430525	122531300	45.33	14	38.77	N
				ATGSTF7,ATGSTF9,GLUTTR,GSTF9 glutathione S-transferase PHI 9	16421573	122078200	24.67	11	50.70	N
				APX1B,APX2 ascorbate peroxidase 2	16429847	8139159	27.75	5	29.20	S
			44	HXXXD-type acyl-transferase family protein	16430525	79073960	45.33	11	30.37	N
				GLX2-2,GLY2 Metallohydrolase/oxidoreductase superfamily protein	16412043	43162280	29.18	6	38.37	N
				GLP10 germin-like protein 10	16430799	11024380	23.43	2	13.18	S
			45	HXXXD-type acyl-transferase family protein	16430525	136455500	45.33	13	36.05	N
				XTH32 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32	16404055	111337100	32.98	8	35.99	N
				ATSFGH,SFGH S-formylglutathione hydrolase	16411565	97212570	37.18	8	33.23	N
			54	ATGLN1;1,ATGSR1,GLN1;1,GSR 1 glutamine synthase clone R1	16416361	150564500	39.30	18	61.24	N
				XTH32 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32	16404055	95884490	32.98	6	34.95	N
				AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1 heat shock cognate protein 70-1	16415348	94643450	71.85	15	30.73	N

**Tabela 3.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **mamão** (continuação).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Carica papaya</i>	Mamão	Phytozome ( <i>Carica papaya</i> )	75	CH-CPN60A,CPN60A,SLP chaperonin-60alpha	16424430	118834900	61.99	27	57.61	N
			76	HSP60,HSP60-3B heat shock protein 60	16426488	117627700	61.37	22	40.59	N
			77	HSP60,HSP60-3B heat shock protein 60	16423207	171436200	48.27	22	57.74	N
			79	AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1 heat shock cognate protein 70-1	16404341	169860700	71.35	20	41.98	N
			80	AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1 heat shock cognate protein 70-1	16404341	179311400	71.35	21	40.43	N
			82	tolB protein-related	16422459	98254770	33.01	14	58.31	N
				AT-HSC70-1,HSC70,HSC70-1,HSP70-1 heat shock cognate protein 70-1	16404341	19114780	71.35	13	27.01	N
			90	Cytosol aminopeptidase family protein	16420439	79280070	59.96	25	52.20	N
				MPPBETA Insulinase (Peptidase family M16) protein	16408662	38174210	55.50	18	52.10	N
			95	ATPase, AAA-type, CDC48 protein	16424441	61372020	35.11	7	32.70	N
				Cytosol aminopeptidase family protein	16420439	44438990	59.96	11	27.77	N
			104	SDH1-1 succinate dehydrogenase 1-1	16423271	38414010	71.43	13	29.84	N

**Tabela 3.** Proteínas identificadas nos 26 spots de interesse selecionados para o **mamão** (conclusão).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Carica papaya</i>	Mamão	Phytozome ( <i>Carica papaya</i> )	105	AtcwINV2, CWINV2 cell wall invertase 2	16405008	34398640	65.61	15	29.36	N
				SDH1-1 succinate dehydrogenase 1-1	16423271	30915440	71.43	12	27.50	N
			106	ATNADP-ME3, NADP-ME3 NADP-malic enzyme 3	16419477	118972700	64.43	19	48.02	N
				AtcwINV2, CWINV2 cell wall invertase 2	16405008	40626450	65.61	21	39.03	N
				LON1, LON_ARA_ARA lon protease 1	16420794	2111196	96.81	7	8.64	<b>S</b>
				UBP12 ubiquitin-specific protease 12	16427407	1628515	100.08	7	8.14	<b>S</b>
			111	MDAR6 monodehydroascorbate reductase 6	16414030	97772590	48.40	13	43.12	N
			115	mtLPD2 lipoamide dehydrogenase 2	16409157	149920600	54.54	23	47.84	N
				HXXXD-type acyl-transferase family protein	16430525	118246600	45.33	15	43.70	N
			119	ALDH2, ALDH2A, ALDH2B4 aldehyde dehydrogenase 2B4	16407193	114059100	58.98	23	54.66	N



**Tabela 4.** Proteínas identificadas nos 27 spots de interesse selecionados para a **mandioca** (continua).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Manihot esculenta</i>	Mandioca	Phytozome ( <i>Manihot esculenta</i> )	1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	32335760	93534780	38.04	11	37.21	N
				Aldolase superfamily protein	32347798	44739210	42.94	7	27.41	S
				AtkdsA1 Aldolase-type TIM barrel family protein	32348285	5233566	30.23	3	20.00	S
				Peroxidase superfamily protein	32332831	2446421	39.19	2	7.98	S
				Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein	32336926	1948620	42.56	3	8.95	S
			2	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	32335760	79714780	38.04	10	33.43	N
				Aldolase superfamily protein	32331201	27240020	39.02	8	30.45	S
				Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein	32336926	2773533	42.56	2	6.65	S
				AtkdsA1 Aldolase-type TIM barrel family protein	32348285	2568856	30.23	3	17.09	S
				Peroxidase superfamily protein	32332831	2060469	39.19	3	10.83	S
			3	ANNAT1,ATOXY5,OXY5 annexin 1	32349156	69991410	36.25	17	49.68	N
				Aldolase superfamily protein	32347798	28954530	42.94	4	16.50	S
				Peroxidase superfamily protein	32332831	4024180	39.19	4	13.39	S

**Tabela 4.** Proteínas identificadas nos 27 spots de interesse selecionados para a **mandioca** (continuação).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Manihot esculenta</i>	Mandioca	Phytozome ( <i>Manihot esculenta</i> )	4	Aldolase superfamily protein	32354358	139561200	38.93	14	62.29	<b>S</b>
				GAPC,GAPC-1,GAPC1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1	32344150	137831700	37.23	9	45.75	<b>S</b>
				Peroxidase superfamily protein	32332831	19363740	39.19	8	23.65	<b>S</b>
				GAPCP-2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 2	32347871	8155787	45.96	4	13.38	<b>S</b>
			5	Aldolase superfamily protein	32354358	149763900	38.93	15	55.87	<b>S</b>
				GAPC,GAPC-1,GAPC1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1	32344150	103883300	37.23	11	48.68	<b>S</b>
				Peroxidase superfamily protein	32332831	12031690	39.19	5	17.38	<b>S</b>
				Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein	32336926	8556962	42.56	3	10.23	<b>S</b>
				GAPCP-2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 2	32347871	5360681	45.96	3	10.09	<b>S</b>
			6	PGK phosphoglycerate kinase	32347687	443390700	42.55	17	58.10	N
				RmIC-like cupins superfamily protein	32356200	14733900	38.34	4	14.00	N
				Eukaryotic aspartyl protease family protein	32343573	6247259	51.80	3	7.07	<b>S</b>
				ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein	32363200	2091373	45.19	3	10.24	<b>S</b>

**Tabela 4.** Proteínas identificadas nos 27 spots de interesse selecionados para a **mandioca** (continuação).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Manihot esculenta</i>	Mandioca	Phytozome ( <i>Manihot esculenta</i> )	7	Aldolase superfamily protein	32354358	369216600	38.93	16	62.85	<b>S</b>
				PGK phosphoglycerate kinase	32347687	338365500	42.55	18	60.10	N
				1,MEE30,PDI11,UNE5 thioredoxin family protein	32340150	15087900	35.74	5	21.21	<b>S</b>
				ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein	32363200	14981840	45.19	5	15.61	<b>S</b>
				RmIC-like cupins superfamily protein	32356200	2844520	38.34	2	7.14	N
			10	ACT7 actin 7	32338478	297363000	41.92	14	50.40	N
				HEMB1 Aldolase superfamily protein	32333370	6242369	47.38	6	18.75	<b>S</b>
			11	Glycosyl transferase, family 35	32332459	546344300	108.21	21	29.28	N
				AtCOR47,COR47,RD17 cold-regulated 47	32336865	221952500	24.68	5	31.19	N
				ACT7 actin 7	32338478	214449600	41.92	14	53.85	N
				Aldolase-type TIM barrel family protein	32330438	104451600	48.31	10	26.47	<b>S</b>
			12	Aldolase-type TIM barrel family protein	32330438	80698480	48.31	15	51.81	<b>S</b>
				AtCOR47,COR47,RD17 cold-regulated 47	32336865	61882830	24.68	5	33.94	N
			15	ACT7 actin 7	32344998	27260080	41.92	3	14.06	N
				Aldolase-type TIM barrel family protein	32340249	9283987	48.55	8	<b>25.11</b>	<b>S</b>

**Tabela 4.** Proteínas identificadas nos 27 spots de interesse selecionados para a **mandioca** (continuação).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Manihot esculenta</i>	Mandioca	Phytozome ( <i>Manihot esculenta</i> )	16	TUB8 tubulin beta 8	32361811	73516610	50.46	15	38.29	N
			17	TUB8 tubulin beta 8	32361811	38919780	50.46	11	32.43	N
			18	ATPDI5,ATPDIL1-1,PDI5,PDIL1-1 PDI-like 1-1	32348862	78809300	55.92	23	52.11	N
				thioredoxin family protein	32343260	1365708	53.96	3	11.59	<b>S</b>
				APA1,ATAPA1 aspartic proteinase A1	32350656	789359	56.45	2	4.47	<b>S</b>
			19	ATPDI5,ATPDIL1-1,PDI5,PDIL1-1 PDI-like 1-1	32332356	17378310	56.54	16	35.40	N
				CH-CPN60A,CPN60A,SLP chaperonin-60alpha	32356405	14146200	62.34	9	21.67	N
			20	ATHSP70,HSP70 heat shock protein 70	32368037	59867890	71.56	19	35.96	N
			21	cpHsc70-2,CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70-2,HSC70-7 chloroplast heat shock protein 70-2	32352939	8387549	75.38	10	19.09	N
			22	THSP70,HSP70 heat shock protein 70	32353148	6499189	71.50	7	15.12	N
			23	Ribosomal L27e protein family	32340978	1549092	155.49	14	13.90	N
			39	Cytosol aminopeptidase family protein	32346502	493420200	61.38	27	60.17	N
				ENO2,LOS2 Enolase	32340769	354390500	48.08	19	62.25	N
AtUGP2,UGP2 UDP-glucose pyrophosphorylase 2	32334598	318332900		51.67	26	68.44	N			

**Tabela 4.** Proteínas identificadas nos 27 spots de interesse selecionados para a **mandioca** (conclusão).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	ID da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Manihot esculenta</i>	Mandioca	Phytozome ( <i>Manihot esculenta</i> )	40	Cytosol aminopeptidase family protein	32346502	579990600	61.38	29	64.10	N
				ENO2,LOS2 Enolase	32340769	393558700	48.08	22	68.54	N
				AtUGP2,UGP2 UDP-glucose pyrophosphorylase 2	32334598	320327700	51.67	27	71.22	N
			51	ATHSP70,HSP70 heat shock protein 70	32368037	100325500	71.56	18	33.95	N
			52	ATHSP70,HSP70 heat shock protein 70	32353148	77151290	71.50	23	47.07	N
			53	ATHSP70,HSP70 heat shock protein 70	32353148	74234730	71.50	24	43.06	N
			54	ATHSP70,HSP70 heat shock protein 70	32353148	60969490	71.50	20	39.81	N
			55	ACT7 actin 7	32338478	451937300	41.92	23	65.78	N
			56	ACT7 actin 7	32338572	391789400	41.92	21	65.25	N

**Tabela 5.** Proteínas identificadas nos 25 spots de interesse selecionados para a **manga** (continua).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Mangifera indica</i>	Manga	Uniprot ( <i>Sapindales</i> )	1	Uncharacterized protein OS Citrus clementina GN CICLE v10000682mg PE 4 SV 1	6637142	64.82	4	6.87	N
				Uncharacterized protein OS Citrus sinensis GN CISIN 1g008033mg PE 4 SV 1	6637142	64.72	4	6.90	N
		Uniprot ( <i>Mangifera indica</i> )	6	actin 1	31454840	41.89	4	16.18	N
		Uniprot ( <i>Sapindales</i> )	7	Uncharacterized protein OS Citrus clementina GN CICLE v10016592mg PE 3 SV 1	42685500	23.45	2	11.98	N
			8	Uncharacterized protein OS Citrus sinensis GN CISIN 1g003056mg PE 3 SV 1	23888360	81.22	9	14.60	N
		Uniprot ( <i>Mangifera indica</i> )	9	actin partial	21727390	18.13	3	25.77	N
			10	actin 1	3162312	41.89	8	12.20	N
				chromosome segregation protein SMC Burkholderia sp TJI49	2696418	66.50	15	19.70	N
			13	actin 1	38971350	41.89	5	19.63	N
				actin 7	8967983	41.88	4	14.59	N
			16	actin 1	17886200	41.88	5	19.63	N
		small GTP Rab		4205802	50.15	5	12.61	N	

**Tabela 5.** Proteínas identificadas nos 25 spots de interesse selecionados para a **manga** (continuação).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Mangifera indica</i>	Manga	Uniprot ( <i>Mangifera indica</i> )	17	small GTP Rab GDI	5058838	50.15	6	18.02	N
			18	small GTP Rab GDI	16218330	50.15	11	28.60	N
			19	small GTP Rab GDI	2571172	50.15	5	12.61	N
		Uniprot (Sapindales)	20	Uncharacterized protein OS Citrus sinensis GN CISIN 1g003165mg PE 4 SV 1	63070230	84.55	23	33.78	N
		Uniprot ( <i>Mangifera indica</i> )	21	sucrose synthase	3118191	30.19	2	9.81	N
		Uniprot (Sapindales)	22	Uncharacterized protein OS Citrus clementina GN CICLE v10018965mg PE 3 SV 1	14544160	85.01	9	13.99	N
		Uniprot ( <i>Mangifera indica</i> )	23	beta galactosidase partial	1161505	40.27	2	8.29	N
			25	alcohol dehydrogenase 1	19909960	42.59	5	16.49	N
				citrate synthase	19610250	30.65	5	19.49	N
				alcohol dehydrogenase 2	10762650	42.39	8	21.47	N
			27	3 ketoacyl CoA thiolase B partial	35951080	45.77	10	39.77	N
				glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	11429010	43.04	6	20.20	N
				actin 1	7360624	41.89	5	19.63	N
			28	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	6280533	43.04	5	15.71	N
		3 ketoacyl CoA thiolase B partial		4445948	45.77	8	34.42	N	

**Tabela 5.** Proteínas identificadas nos 25 spots de interesse selecionados para a **manga** (conclusão).

Nome científico	Nome popular	Banco de dados	Spot	Descrição da proteína	Score	Massa molecular (kDa)	Peptídeos coincidentes	Cobertura de sequência (%)	Família de proteína coincidente com o levantamento taxonômico
<i>Mangifera indica</i>	Manga	Uniprot ( <i>Mangifera indica</i> )	29	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase Fragment OS Anacardium occidentale PE 3 SV 1	27639810	21.34	6	43.28	N
			30	3 ketoacyl CoA thiolase B partial	30056660	45.77	13	50.70	N
			31	3 ketoacyl CoA thiolase B partial	115653200	45.77	16	54.42	N
				actin 1	23604170	41.89	5	19.63	N
			32	3 ketoacyl CoA thiolase B partial	124171900	45.77	13	47.44	N
			33	3 ketoacyl CoA thiolase B partial	37629030	45.77	6	27.91	N
			34	3 ketoacyl CoA thiolase B partial	5073134	45.77	3	13.02	N
35	elongation factor 1 alpha partial Coccus formicarii	12459280	16.97	2	12.34	N			



## Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

.....

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

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

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

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

NOME/TELEFONE PARA RECADO:.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F

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

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE:.....

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

NOME/TELEFONE PARA RECADO:.....

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **“IDENTIFICAÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS ALÉRGENOS REGIONAIS”.**

PESQUISADORA: **Dra. Keity Souza Santos**

CARGO/FUNÇÃO: Bióloga/Pesquisadora

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica – Serviço de Alergia e Imunopatologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO X

RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem por objetivo identificar novas moléculas que causam alergias, provenientes de alimentos e venenos de insetos e identificar possíveis reações cruzadas destas moléculas alergênicas com outras já conhecidas, como os alérgenos do látex, a fim de criar um sistema de estudo laboratorial para a identificação de novos alérgenos e estudos de reação cruzada para aprimorar o tratamento das alergias. Isto porque quando se conhece a molécula alergênica responsável pela doença, o tratamento adequado melhora muito a qualidade de vida do paciente. Você será informado da alergia confirmada e dos resultados posteriores em relação à reatividade cruzada. Estas informações serão úteis para ajudar o médico a escolher o melhor tratamento porque já se conhecerá o alérgeno responsável pela sua doença;

2 – Para a confirmação do diagnóstico, o paciente será submetido a testes de puntura na pele ou orais (para ter contato com a provável molécula alergênica), dependendo da alergia. Estes procedimentos não-rotineiros podem desencadear reações alérgicas e por isso somente serão realizados no ambulatório de alergia do HCFMUSP contando com infraestrutura hospitalar, caso seja necessário, apenas por médicos alergistas especializados;

3 – Rotineiramente, será coletado sangue em quantidade de no máximo 20 mL, por punção periférica da veia do antebraço. O material será utilizado para confirmação do diagnóstico clínico e para identificação dos alérgenos específicos e possíveis reatividades cruzadas. Uma parte desse material será armazenada e poderá ser utilizado para análises em projetos futuros na área de alergia por este mesmo grupo de pesquisa. Não há riscos esperados nos procedimentos deste item;

4 – Os riscos esperados nos procedimentos do item 3 são as reações alérgicas que podem ocorrer durante o contato com o alérgeno, porém este procedimento será realizado por médicos alergistas preparados para tratar qualquer manifestação alérgica gratuitamente. Não há riscos esperados nos procedimentos do item 2;

5 – Este estudo lhe beneficiará porque você será informado da alergia confirmada e dos resultados posteriores em relação à reatividade cruzada. Estas informações serão úteis para ajudar o médico a escolher o melhor tratamento porque já se conhecerá o alérgeno responsável pela sua doença, o que melhorará a sua qualidade de vida;

6 – Não há procedimentos alternativos a este estudo que possam ser vantajosos;

7 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é a Dra. **Keity Souza Santos** que pode ser encontrada no Ambulatório de Alergia (5º andar PAMB) Telefone(s) 2661.6098 ou no laboratório na FMUSP tel 3061.8396, ou ainda no celular (11) 98110.7043. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br);

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

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

10 – Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Também será devidamente informado dos resultados dos exames;

11 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação;

12 – Parte do material coletado e informações sobre este material serão armazenadas para análises em projetos futuros na área de alergia por este mesmo grupo de pesquisa.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(...) SIM. Eu quero ser consultado(a) para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(...) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “IDENTIFICAÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS ALÉRGENOS REGIONAIS”.

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

-----

Assinatura do paciente/representante legal    Data \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

-----

Assinatura da testemunha                                  Data \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----

Assinatura do responsável pelo estudo                  Data \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

## Anexo B – Parecer Consubstanciado do Hospital das Clínicas da FMUSP



**Hospital das Clínicas da FMUSP**  
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** IDENTIFICAÇÃO, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS ALÉRGENOS REGIONAIS.  
**Pesquisador Responsável:** Fabio Fernandes Morato Castro **Versão:** 3  
**Pesquisador Executante:** Keity Souza Santos **CAAE:** 18414513.9.0000.0068  
**Co-autores:** Ariana Campos Yang, Clóvis Eduardo Santos Galvão, Helen Andrade Arcuri, Karine Marafigo De Amicis, Alexandra Sayuri Watanabe, Jorge Kalil, Adriano Mari, Gabriele Gadermaier, Mario Sergio Palma  
**Instituição:** HCFMUSP  
**Departamento:** CLÍNICA MÉDICA

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Registro on-line:** 10965

**Número do Parecer:** 1.376.477

**Data da Relatoria:** 16/12/2015

**Apresentação do Projeto:** Trata-se da notificação da utilização de amostras coletadas em projeto de pesquisa previamente aprovado ("Identificação, produção e caracterização de novos alérgenos regionais", de responsabilidade do Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato Castro, do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP; aprovação CAPPesq CAAE:18414513.9.0000.0068), por estudo em desenvolvimento na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos, área de Bromatologia que comporá parte da tese de doutorado de Gabriela Justamante Händel Schmitz, sob orientação do Prof. João Roberto Oliveira do Nascimento, intitulado "Clonagem, expressão recombinante e validação por microarray de proteínas alimentares potencialmente alergênicas". Serão utilizadas amostras já coletadas no projeto original para ensaios de western blot 2D. Não haverá necessidade de obtenção de novos materiais biológicos.

**Objetivo da Pesquisa:** Clonar, expressar e purificar proteínas potencialmente alergênicas de alimentos de importância regional. Tais proteínas serão utilizadas na construção e validação de um microarray por meio de ensaios com soro de pacientes alérgicos aos alimentos selecionados. Inicialmente, serão realizados experimentos relativos a cinco alimentos (abacaxi, mamão, mandioca, manga e jaca), pelo fato dos soros de pacientes alérgicos aos mesmos já estarem disponíveis.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:** Nenhum risco - utilização de amostras previamente coletadas em ensaios in vitro.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:** O estudo contará com a participação de 3 grupos de pesquisa (2 nacionais e 1 internacional).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:** Adequado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** Nada a declarar.

**Situação do Parecer:** Aprovado.

**Necessita Apreciação da CONEP:** Não.

São Paulo, 16 de Dezembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur  
Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa – CAPPesq